

**Untersuchungen über die
Beeinflussung der Progesteronsekretion
boviner Luteinzellkulturen durch
verschiedene Opioide**

Wulf Jordan

Disbui. München

1989

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl
und dem
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. R. Schulz

Untersuchungen über die Beeinflussung der
Progesteronsekretion boviner Luteinzellkulturen
durch verschiedene Opiode

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
WULF JORDAN
aus
Lauingen

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr.habil. W. Rambeck

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Opioide	3
2.1.1. Einteilung der Opioide	4
2.1.2. Multiple Opioidrezeptoren	6
2.1.3. Bindungsmechanismen und deren zelluläre Grundlage	9
2.2. Das Opioidsystem in der Kontrolle der endokrinen Sekretion	11
2.2.1. Modulation übergeordneter Zentren durch Opioide	11
2.2.1.1. Rolle der Opioide bei der LH-/FSH-Freisetzung	13
2.2.1.2. Beeinflussung von Vasopressin und Oxytocin durch Opioide	16
2.2.2. Die endokrine Sekretion peripherer Organe in Abhängigkeit von Opioiden	17
2.3. Mögliche Ansatzpunkte für Wirkungen von Opioiden auf Progesteronsynthese und -sekretion des Corpus luteum	19
2.3.1. Vorbemerkungen	19
2.3.2. Wichtige lokale Regulationsmechanismen in der Progesteronsynthese und -sekretion des Corpus luteum	20
2.3.2.1. Katecholaminerge Innervation und Biogene Amine	20
2.3.2.2. Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels	22
2.3.2.3. Steroid-binding-protein	23
2.3.2.4. Zyklische Nukleotide und Second-messenger-Systeme	23
2.3.2.5. Intraovarielle nichtsteroidale Regulatoren	24
3. Eigene Untersuchungen	26
3.1. Material	26
3.2. Methode	26
3.2.1. Gewinnung der Gelbkörper	27
3.2.2. Verarbeitung zu aussaatfähiger Zellsuspension	27
3.2.2.1. Nährmedien und Enzymlösungen	27
3.2.2.2. Mechanische Zerkleinerung	29
3.2.2.3. Enzymatische Dispergierung	31
3.2.2.4. Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung	32
3.2.3. Aussaat und Inkubation	33
3.2.3.1. Inkubation der Zellkulturen mit serumhaltigem Medium	34
3.2.3.2. Serumfreies Medium	34

3.2.4.	Einsatz von Substanzen in der bovinen Luteinzellkultur	35
3.2.4.1.	Verwendung eines LH-Agonisten zur Stimulation der Progesteronsekretion	35
3.2.4.1.1.	Vorversuche zur Stimulation mit hCG	36
3.2.4.1.2.	Standardisierung	36
3.2.4.2.	Einsatz von Opioiden in der Luteinzellkultur	38
3.2.4.2.1.	Beschreibung der einzelnen Substanzen	38
3.2.4.2.2.	Standardisierung	39
3.2.5.	Inkubationszeiträume	40
3.2.6.	Entnahme und Aufbewahrung des Kulturüberstandes sowie Aufbewahrung des Zellrasens	41
3.2.7.	Progesteronmessung im Kulturüberstand	41
3.2.7.1.	Verfahren	41
3.2.7.2.	Vorversuche zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Enzymimmunitests (EIA)	42
3.2.7.3.	Standardisierung	44
3.2.8.	Bestimmung des Gehalts an β -Endorphin und Protein im Zellkulturrasen	45
3.2.8.1.	Proteinbestimmung im Zellrasen	45
3.2.8.2.	β -Endorphinbestimmung im Zellrasen	46
3.2.9.	Statistische Auswertung	46
3.3.	Ergebnisse	47
3.3.1.	Die Kultivierung von Luteinzellen unterschiedlicher Gelbkörperstadien	47
3.3.2.	Stimulierbarkeit kultivierter Luteinzellen durch hCG	48
3.3.3.	Zugabe von Opioiden	51
3.3.3.1.	Einfluß von Opioiden auf die Basalsekretion	52
3.3.3.2.	Einfluß von Opioiden auf die stimulierte Progesteronsekretion bei 12 - stündiger Inkubation	54
3.3.3.3.	Einfluß von Opioiden auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion in unterschiedlichen Inkubationszeiträumen	61
3.3.3.3.1.	μ - Ligand	62
3.3.3.3.2.	δ - Ligand	66
3.3.3.3.3.	κ - Ligand	69
3.3.3.3.4.	Naloxon	73
3.3.3.4.	Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß von Opioiden	75
3.3.3.5.	Untersuchungen zur Dauer des Opioideneinflusses nach Entfernung der Testsubstanz aus dem Kulturmedium	77
3.3.4.	Protein- und β -Endorphingehalt im Zellrasen	80
3.3.4.1.	Protein	80
3.3.4.2.	β -Endorphin	81

4.	Diskussion	82
5.	Zusammenfassung	93
6.	Summary	96
7.	Literaturverzeichnis	99
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Kenntnisse auf dem Gebiet der neuroendokrinen opioidergen Regulation der Fortpflanzung sind in den letzten Jahren ungewöhnlich stark angewachsen. Man konnte unter anderem sowohl natürliche Opioidpeptide als auch Opioidrezeptoren in peripherem Gewebe nachweisen und hatte damit der Hypothese von der lokalen Wirkung als Modulator, Mediator oder hormonähnlichem Wirkstoff den vorläufigen Rahmen gegeben. Das dabei entstandene Defizit im Verständnis der Mechanismen, deren sich die Opioide bei ihrem Eingreifen bedienen, ist jedoch bis heute geblieben.

Parallel dazu läuft eine Entwicklung, die zu neuen Konzepten in der Beurteilung von Steuerung und Funktion des Gelbkörpers führte. Von besonderer Bedeutung war eine Reihe von Berichten über nichtsteroidale Regulatoren, die das Ovar selbst produziert. Aber auch hierbei sind über die Wirkmechanismen nur rudimentäre Erklärungen bekannt geworden.

In vorliegender Arbeit wird der Versuch unternommen, in einem Bioassay die möglichen Effekte verschiedener Opioide auf die Freisetzung von lutealem Progesteron darzustellen.

Dabei findet das Modell der Luteinzellkultur im Monolayerverfahren als Bioassay Anwendung. Es bietet die Möglichkeit, endokrine Leistungen des Corpus luteum, bei diesen Untersuchungen die Progesteronsekretion, zu erfassen.

Die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Opioidinflüsse, Affinitätsmodulierbarkeiten der Rezeptoren, Toleranzphänomene und andere Faktoren ergeben eine vielschichtige Problematik in der Anwendung der Opioiden als Testsubstanzen in der Luteinzellkultur. In den eigenen experimentellen Ansätzen wird der Frage nachgegangen, ob ein opioiderger Einfluß bei der Freisetzung von Progesteron aus kultivierten Luteinzellen vorliegt und welcher Art er sein könnte.

2. Literaturübersicht

2.1. Opioid

Opium, der Saft des Schlafmohns, *Papaver somniferum*, enthält mehr als 20 verschiedene Alkaloide. Im Jahre 1806 konnte SERTÜRNER mit Morphin erstmals eine Reinsubstanz isolieren. Alle in der Folge aus jener Stammsubstanz isolierten Stoffe mit vergleichbarer Wirkung, wie Kodein, Papaverin, aber auch die als Antagonisten bzw. Partialantagonisten wirkenden Substanzen wie Naloxon, Pentazocin, Butorphanol und Buprenorphin bezeichnet man als Opiate.

Erst 1973 konnte biochemisch die Existenz von stereospezifischen Opiatbindungsstellen im Zentralen Nervensystem (ZNS) von verschiedenen Tieren und dem Menschen nachgewiesen werden (PERT und SNYDER, 1973). Schon vorliegende Hinweise auf Rezeptoren, wie z.B. Antagonisierbarkeit, selektive Wirkungen unterschiedlicher Opiate und sehr kleine K_d -Werte, als Ausdruck einer hohen Affinität der Substanz zum Effektor, konnten somit erhärtet werden.

1975 schließlich konnte HUGHES Peptidmoleküle mit morphinähnlichen Eigenschaften aus dem Gehirn isolieren. Später setzte die Suche nach den Zusammenhängen zwischen diesen endogen produzierten Substanzen und den bekannten neuroendokrinen Steuermechanismen ein.

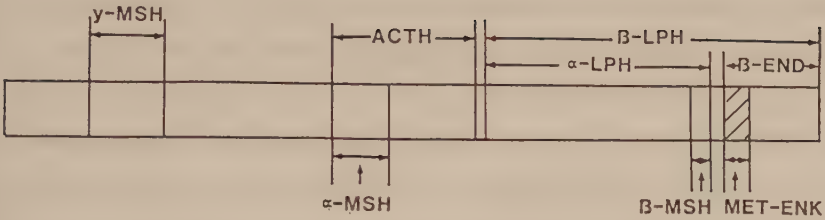
Unter dem Oberbegriff Opioide werden in der heute gebräuchlichen Nomenklatur die Opioidpeptide als eigenständige Gruppe neben den alkaloiden Opiaten geführt.

2.1.1. Einteilung der Opioidpeptide

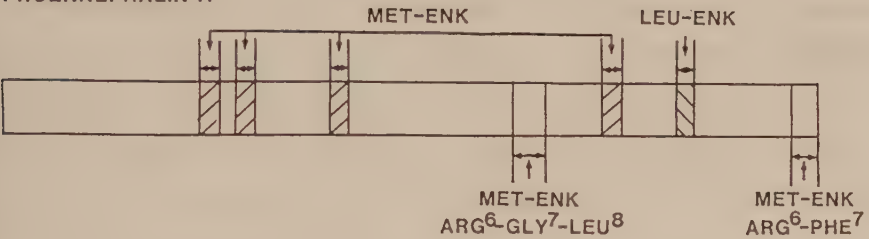
Mit dem Begriff Opioidpeptide bezeichnet man eine Gruppe von Peptiden mit opioidähnlicher Wirkung. Die endogenen Opioidpeptide, von denen heute etwa 20 bekannt sind, stammen von drei Vorläuferpeptiden ab (vgl. Abb. 1):

- a) Proopiomelanocortin (POMC) ist der Vorläufer von β -Endorphin; weitere Spaltprodukte des POMC sind unter anderem das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das melanozyten-stimulierende Hormon (MSH) und das β -lipotrope Hormon (β -LPH).
- b) Proenkephalin A ist der Vorläufer u.a. der kurzkettigen Enkephaline - verschiedener Pentapeptide mit charakteristischen Aminosäuresequenzen.
- c) Aus der Proenkephalin-B- oder Prodynorphin-Vorstufe lassen sich u.a. die Dynorphine und Neoendorphine ableiten.

PRO-OPIOMELANOCORTIN



PROENKEPHALIN A



PRODYNORPHIN

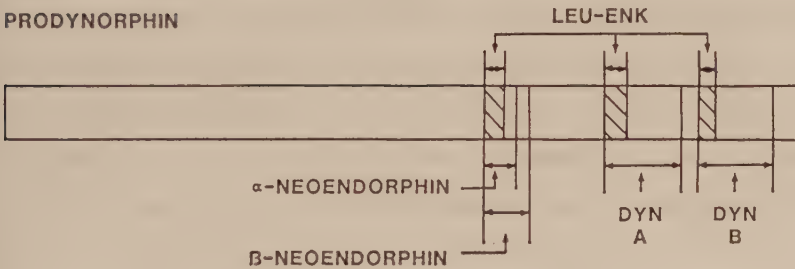


Abb. 1: Schema der Aminosäuresequenzen von den Vorläufermolekülen und die Position der endogenen Opioidpeptide (modifiziert nach JAFFE und MARTIN, 1985).

Verwendete Abkürzungen: MSH = Melanozyten stimulierendes Hormon; ACTH = Adrenocorticotropes Hormon; LPH = Lipotropes Hormon; LEU-ENK = Pentapeptid (Enkephalin) mit Leucin an Position 5; MET-ENK = Pentapeptid (Enkephalin) mit Methionin an Position 5; MET-ENK (ARG⁶-PHE⁷) = am Carboxyl-Terminal erweitertes Met-Enkephalin (Heptapeptid); MET-ENK (ARG⁶-GLY⁷-LEU⁸) = am Carboxyl-Terminal erweitertes Met-Enkephalin (Oktapeptid); DYN A/B = Dynorphin A/B.



Daneben sind einige Opioidpeptide, die nicht den genannten Precursoren entstammen, bekannt. Aus dem β -Casein der Milch von Rind, Schaf und Büffel läßt sich z.B. das β -Casomorphin hydrolysieren und die Amphibienhaut enthält das sogenannte Dermorphin. Sie unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz, vor allem in der des Enkephalinteils von den endogenen Opioidpeptiden. Zu diesen "Exorphinen" zählen außerdem noch opioidähnlich wirkende Substanzen, die wahrscheinlich alkaloider Natur sind (SCHULZ und EHRENREICH, 1985).

2.1.2. Multiple Opioidrezeptoren

Wegen der uneinheitlich hemmenden und erregenden Effekte von Opiaten postulierte MARTIN schon 1967 die Existenz von mehreren Rezeptoren für Opiate und deren Abkömmlinge. Um dieses Postulat verifizieren zu können, mußte man neue Versuchsmodelle entwickeln. In den bisher angewandten war es nicht möglich, Substrat und Rezeptorsystem getrennt zu untersuchen.

Erst im chronisch spinalisierten Hund, bei dem das Rückenmark ab Thorakalhöhe nach distal ausgeschaltet ist, konnten MARTIN et al. (1976) tatsächlich sehr unterschiedliche pharmakologische Profile von verschiedenen Opiaten darstellen.

Mit einem weiteren, neuen Versuchsmodell war eine erste Einteilung der Opiode nach der Bindung zu einigen Rezeptoren möglich.

Man verwendete dabei den Längsmuskel mit anhaftendem Plexus myentericus des Meerschweinchenileums und bestimmte die relative Fähigkeit der Opiode zur Hemmung der elektrisch stimulierten Kontraktionen des isolierten Präparats (LORD et al., 1977).

Neben dem Dünndarm des Meerschweinchens (Guinea pig ileum, GPI) dienten auch Vasa deferentia von Maus (Mouse vas deferens, MVD), Ratte (Rat vas deferens, RVD) und Kaninchen (Rabbit vas deferens, RaVD) für analoge Untersuchungen. Es zeigte sich, daß im Dünndarm des Meerschweinchens hauptsächlich Wirkungen von Morphinderivaten (Bezeichnung des entsprechenden Rezeptortyps daher mit μ) bzw. Ketocyclazocin (über k -Rezeptoren) und im Vas deferens der Maus Wirkungen der Enkephaline (über δ -, aber auch μ - und k -Rezeptoren) vermittelt werden. Das Vas deferens der Ratte, welches sich als morphin- und enkephalinunempfindlich erwies, war hochempfindlich gegenüber β -Endorphin (ϵ -Rezeptor) und im Vas deferens des Kaninchens war Ketozyclazocin (k -Rezeptor) das potenteste Opioid.

Über Bindungsstudien mit Opiaten und Opioidpeptiden in Membranpräparationen des Gehirns und anderer Organe wurden schließlich vier verschiedene Opioid-Rezeptortypen definiert. Zu jedem einzelnen existieren vermutlich noch mehrere Subtypen (WÜSTER et al., 1981).

Eine Übersicht über Opioidrezeptoren und die entsprechenden exogenen bzw. endogenen Liganden einschließlich deren relativer Affinität sowie ihrer Antagonisierbarkeit durch Naloxon, kann man aus Tabelle 1 ersehen.

Tab. 1: Klassifikation von Opioidrezeptoren, die relative Affinität von den entsprechenden Liganden und ihre Antagonisierbarkeit durch Naloxon (nach HUGHES, 1981).

Bezeichnung des Rezeptors	Affinität zum Rezeptor	Antagonisierbarkeit durch Naloxon ¹ (nM)
μ	β -End > Mor > Met-Enk > Leu-Enk	1 - 3
δ	Leu-Enk > Met-Enk > β -End >> Mor	20 - 40
κ	Ethylketocyclazozin (EKC)	6 - 12
ϵ	β -End	?

Verwendete Abkürzungen: β -End = β -Endorphin; Mor = Morphin; Met-Enk = Methionin-Enkephalin; Leu-Enk = Leucin-Enkephalin.

¹ Angabe der Konzentration, bei der die Anzahl der Rezeptoren zur einen Hälfte Antagonist und zur anderen Agonist gebunden haben (K_d -Wert).

Verschiedene Untersucher hatten aufgezeigt, daß mehr als ein Rezeptor z.B. an der zerebralen Analgesie oder an nozizeptiven Erregungen (z.B. Schmerz) auf spinaler Ebene beteiligt sind (PASTERNAK et al., 1980; SNYDER und GOODMAN, 1980). Man konnte vice versa schließen, daß keine direkte Beziehung zwischen der Aktivierung eines bestimmten Rezeptors und einem pharmakologischen Effekt besteht.

Diese Beziehungen meinte man durch Verabreichung selektiver Liganden aufklären zu können. In der Praxis jedoch erwiesen sich die Selektivitäten der bekannten Liganden als nicht ausreichend präzise. Über die Ausschaltung einzelner Rezeptoren mittels induzierter Toleranz konnte man trotzdem pharmakologische Effekte mit der Interaktion verschiedener Rezeptortypen erklären (SCHULZ et al., 1981).

In der Zwischenzeit wurden weitere Derivate von Opioidliganden synthetisiert, die mit einer sehr viel höheren Selektivität an die genannten Rezeptortypen binden (SCHULZ und EHRENREICH, 1985).

Die Multiplizität der Opioidrezeptoren und Opioidliganden ist fester Bestandteil in der Betrachtungsweise von Funktionen endogener Opioidpeptide im Säugerorganismus und deren Mechanismen geworden.

2.1.3. Bindungsmechanismen und deren zelluläre Grundlage

PFEIFFER et al. (1982) stellten mittels Experimenten, in denen sie mehrere Markersubstanzen zur kompetitiven Verdrängung einsetzten, fest, daß die Wirkungen verschiedener Opioidrezeptoren unterschiedlich durch Guanylnukleotide und Metallionen reguliert werden.

Auch werden eine Modulation des Adenylat-Cyclase-Systems sowie eine Veränderung des Ca^{2+} -Influxes in Nervenzellendigungen mit der Wirkung von Opioiden in Verbindung gebracht. Dabei scheint ersteres eher eine Erklärung der Toleranz- und Abhängigkeitsphänomene von Langzeiteinwirkung zu sein und letzteres für den akuten Effekt von Opioiden zu stehen (WEST und MILLER, 1983).

Der Ligand selbst wurde in seiner molekularen Konfiguration als für den Mechanismus der Ligand-Rezeptor-Bindung wichtiger Faktor diskutiert. Es wird vermutet, daß der N-Terminus am β -Endorphinmolekül, die sogenannte "adresse", einer Opioidwirkung als Neuro-modulator bzw. -transmitter im ZNS dienlich ist. Das Carboxyl-Terminal, die sogenannte "message", ist möglicherweise für eine Hormonwirkung im peripheren Gewebe verantwortlich (MILLAN und HERZ, 1985).

2.2. Das Opioidsystem in der Kontrolle der endokrinen Sekretion

In der Human- und Tiermedizin werden die Kenntnisse des vielschichtigen Opioidsystems bis dato dazu genutzt, Opiate als Psychopharmaka, Analgetika oder als Intestinalregulans einzusetzen. Sie zeigen aber auch pharmakologische Effekte in anderen Organsystemen, wie z.B. in den zu endokrinen Organen gehörigen Steuerzentren oder in den betreffenden Organen selbst.

2.2.1. Modulation übergeordneter Zentren durch Opiode

Der Hypothalamus und vorgeschaltete Hirnregionen scheinen die Ebenen zu sein, auf denen sich die eigentliche Wirkung der Opiode entfaltet. TRAMU und LEONARDELLI (1979) vermuten dies aufgrund immunohistochemischer Lokalisation von Enkephalinen und Rezeptoren im Hirnstamm.

In einem von BLANK et al. (1985) modifizierten Funktionsmodell nach KALRA (1983) werden am Beispiel der Gonadotropinsekretion die bekannten Kontrollebenen einschließlich ihrer opioden Komponenten veranschaulicht (Abb. 2).

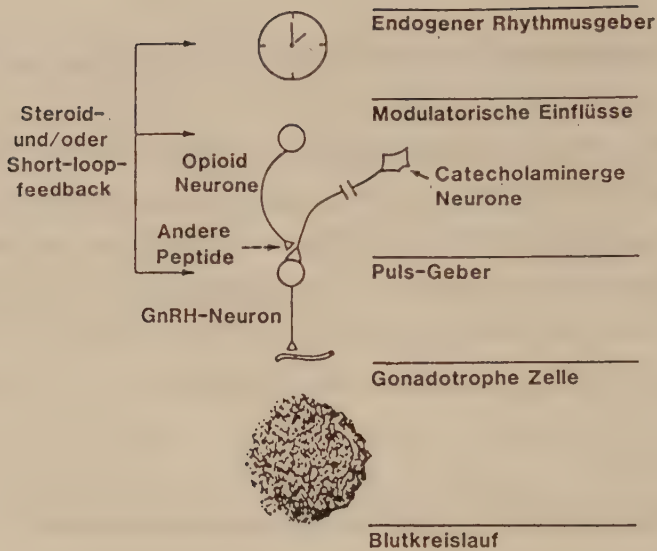


Abb. 2: Übergeordnete Kontrollebenen zur hypophysären Gonadotropinsekretion (nach BLANK et al., 1985).

Ein endogener Rhythmusgeber auf der obersten Ebene kontrolliert den GnRH-Puls, der für die periodische LH-Ausschüttung verantwortlich ist. Auf der nächsten Ebene finden sich modulierende Einflüsse (Opioide, Katecholamine und andere Peptide enthaltende Neurone), die aus verschiedenen Hirnregionen über axon-axonale Verbindungen das GnRH-Neuron erreichen. Der GnRH-Pulsgeber verarbeitet die modulierenden Einflüsse zu vermehrter oder verminderter GnRH-Ausschüttung. Auf diesen drei Ebenen treten modifizierende Effekte durch Steroid- und/oder GnRH-short-loop-feedback auf. Das Dekapeptid GnRH wird ausgeschüttet und gelangt über das Hypophysen-Pfortadersystem zu den gonadotrophen Zellen des Vorderlappens; dort aktiviert es über hochaffine Rezeptoren die Mechanismen der LH-Sekretion.

Das natürliche Vorkommen von Opioidliganden bzw. -rezeptoren in Zentren, die die Fortpflanzung steuern, ist besonders hoch in der Hypophyse. Nur ihr nervaler Anteil scheint frei von endogenen Opioidpeptiden zu sein, weist aber signifikant hohe Gehalte an Opioidrezeptoren auf (MILLAN und HERZ, 1985).

VUOLTEENAHÖ und Mitarbeiter (1982) berichten von Untersuchungen mit Ratten, in denen die Ausschüttung von β -Endorphin ins Plasma und hypothalamische Gewebe einer circadianen Rhythmik unterliegt, die sich parallel zum Plasmaspiegel der Corticosteroide verhält.

2.2.1.1. Rolle der Opioide bei der LH-/FSH-Sekretion

Die sogenannte "Dual-Control-Hypothesis" hat sich als Modell zur Erklärung der basalen bzw. zyklischen LH-Sekretion eingebürgert. Erstere wird dem mediobasalen Hypothalamus, letztere dem vorderen Teil des Hypothalamus mit enger Verbindung zum limbischen System zugeordnet (WENGER und LEONARDELLI, 1980).

Allgemein nimmt man für die pulsatile LH-Sekretion einen hemmenden Opioideffekt an, der durch gleichzeitige Naloxongabe aufgehoben werden kann (MEITES, 1984).

Sowohl eine LH-Hemmung als auch eine LH-Stimulation ("Dual effect") von Morphin, was durch unterschiedlich hoch dosierte Morphingaben in einen Hirnventrikel (intraventrikulär, i.v.t.) männlicher Ratten aufgezeigt werden konnte, beschrieben PIVA et al. (1984). Sie berichten auch von einem "paradoxen" Effekt, bei dem Opioidagonist und -antagonist, ebenfalls i.v.t. verabreicht, die gleiche Wirkung zeigten.

Als Erklärung für beide Effekte werden zwei Hypothesen aufgestellt:

- a) In den der Hypophyse übergeordneten Ebenen befinden sich neben Opioidmechanismen, die die LH-Sekretion hemmen, ebenso Mechanismen, die die LH-Sekretion stimulieren können.
- b) Hemmende bzw. stimulierende Effekte von Opioidliganden auf die LH-Sekretion werden durch verschiedene Klassen von Opioidrezeptoren vermittelt; so soll der μ -Rezeptor für die Hemmung, der δ -Rezeptor für die Stimulation verantwortlich sein.

Ein zusätzlicher Gesichtspunkt, den PIVA et al. (1984) berücksichtigen, ist die unterschiedliche Affinitätsänderung von Opioidrezeptoren durch das Steroidmilieu; während die LH-stimulierenden δ -Rezeptoren durch Steroide modulierbar sind, gilt dieses für μ -Rezeptoren nicht.

Verschiedene Autoren diskutieren eine Mediatorfunktion von Opioiden im negativen Feedback der Gonadensteroiden auf die LH-Ausschüttung (TROUT und MALVEN, 1984; BHANOT und WILKINSON, 1985; BROOKS et al., 1986).

Detaillierter sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen, die ergeben, daß die testikuläre Steroidsekretion im peripubertalen Zeitraum eine determinierende Rolle in der opiatempfindlichen LH-Sekretion erwachsener Ratten spielt (ALMEIDA et al., 1987). Dabei wird diese Wirkung der Gonadensteroiden auf die Funktion des ZNS in zwei unterschiedlichen Ausprägungen dargestellt: In eine nur die Aktivierung betreffende, die bei Verlust - z.B. durch präpubertale Kastration - bald restauriert wird und in eine die Organisation betreffende, welche bei Verlust - z.B. postpubertale Kastration - die opioiderge LH-Inhibition irreversibel aufhebt.

Trotz einiger widersprüchlicher Berichte neigt man allgemein zur Feststellung, daß es keinen Opioideinfluß auf die hypophysäre FSH-Ausschüttung gibt (MILLAN und HERZ, 1985; MEITES, 1984).

2.2.1.2. Beeinflussung von Vasopressin und Oxytocin durch Opioide

Im Intermediär- und Neurallappen der Hypophyse wurden hohe Opioidpeptidgehalte in Oxytocin (OT) bzw. Vasopressin (VP) enthaltenden Neuronen immunohistochemisch nachgewiesen (MARTIN et al., 1983). Es wird vermutet, daß diese Opioidpeptide auch unabhängig von Oxytocin und Vasopressin auftreten. Hingegen vertreten MILLAN et al. (1984 a) die Ansicht, daß die gemeinsame Lokalisation von Dynorphin (Dyn) und Vasopressin bzw. Methionin-Enkephalin (Met-Enk) und Oxytocin in Granulen und Organellen für eine gemeinsame physiologische Kontrolle der Sekretion spricht. Außerhalb der Hypophyse produziertes Vasopressin bzw. Oxytocin läßt sich nach MILLAN et al. (1984 b) nicht mit Dyn- bzw. Met-Enk-ähnlichen Peptiden korrelieren.

2.2.2. Die endokrine Sekretion peripherer Organe in Abhängigkeit von Opioiden

Konkrete Hinweise auf eine physiologische Rolle in der Blutbahn zirkulierender Opiode gibt es noch nicht. Es ist nicht geklärt, ob Opiodeffekte Ausdruck einer physiologischen Rezeptoraktivierung durch zirkulierende Opiode sind oder ob sie durch Opiode, die aus intrinsischen Neuronen ausgeschüttet werden, verursacht werden (MILLAN und HERZ, 1985).

Ähnlich äußern sich HOLADAY et al. (1984), die neben Effekten von ZNS-Opioiden, welche respiratorische und kardiovaskuläre Funktionen regulieren, bzw. von in peripheren Neuronen vorkommenden Opioiden auch eine Wirkung zirkulierender Opiode erwarten.

In allen Zielorganen muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Wirkung zirkulierender Opiode im einfachsten Fall durch Interaktion mit Rezeptoren an peripheren Nervenendigungen zustande kommt (MILLAN, 1982). Die Lipolyse und Glycerolfreisetzung durch β -Endorphin ist keine Opioidwirkung im engeren Sinn, wie auch die Beeinflussung der Steroidogenese in der Nebennierenrinde möglicherweise nichtopioider Natur ist (RICHTER et al., 1983; SCHWANDT, 1981).

Auch WALKER et al. (1982) weisen darauf hin, daß nichtopiode Effekte des β -End von Bedeutung sein könnten und deswegen eine Re-

sistenz gegen den spezifischen Antagonisten der Opioidwirkung, Naloxon, nicht artifiziell oder irrelevant sein muß. MILLAN und HERZ (1985) bemerken dazu, daß in der Blutbahn zirkulierende Opiode meist zusammen mit einem am gleichen Ort gespeicherten nichtopioiden Gegenstück, z.B. Katecholamin, freigesetzt werden.

In Tabelle 2 werden exemplarisch einige Opioidwirkungen anhand von Stoffwechsel- bzw. Sekretionsleistungen peripherer Organe dargestellt.

Tab. 2: Periphere Wirkungen von Opioiden (HUGHES, 1981).

Tier-art	Organ	Durch Opiode verursachte Wirkung
Ratte	Magen	Hemmung der Somatostatinfreisetzung.
Ratte	Dünndarm	Hemmung der PGE ₁ -simulierten Adenyl-cyclase-Aktivität und des Wassertransports.
Hund	Exokrine Pankreas	Hemmung von Bikarbonat-, Wasser- und Enzymsekretion, die durch Pankreassekretion oder Ansäuerung des Duodenums hervorgerufen werden kann.
Hund	Endokrine Pankreas	Hemmung der Somatostatinfreisetzung mit darauf folgendem Anstieg der Insulin/Glukagonsekretion.
(nicht genannt)	Nebennierenrinde	Anstieg der Corticosteronproduktion.
(nicht genannt)	Fettzellen	Erhöhte Phosphofructokinaseaktivität erniedrigte Phosphohexoseisomeraseaktivität, erhöhte Lipolyse (nicht mit Naloxon abzublocken).
(nicht genannt)	Niere	Erniedrigte Ornithin-decarboxylaseaktivität.

2.3. Mögliche Ansatzpunkte für Wirkungen von Opioiden auf Progesteronsynthese und -sekretion des Corpus luteum

Die ersten Ansätze zur Klärung opioiderger Einflüsse auf periphere endokrine Organe im Rahmen der Fortpflanzung wurden am männlichen Tier gemacht. Obwohl auch dort die neuroendokrinen Steuermechanismen in direkter Kommunikation mit dem Endorgan stehen, lassen sich die Verhältnisse nicht ohne weiteres auf den weiblichen Organismus übertragen.

2.3.1. Vorbemerkungen

Allgemein wird für die Nebennierenrinde (HOLZBAUER, 1957) wie für Leydig'sche Zellen des Hodens (CHRISTENSEN, 1975) angenommen, daß Steroide ausgeschüttet werden, sobald sie synthetisiert worden sind.

Auch im Gelbkörper ging man lange Zeit von einer sofort der Produktion folgenden Sekretion aus, da sich der Blutspiegel des Progesterons parallel zum Progesterongehalt im Lutealgewebe verhält (DIEKMAN, 1978).

Im ovinen Corpus luteum gelang GEMMELL und STACY (1977) mit Kolchizin eine selektive Blockade der Progesteronsekretion. In der gleichen Versuchsanordnung erhöhte LH die synthetisierte Proge-

steronmenge, jedoch blieb die sezernierte Menge gleich hoch wie ohne LH-Zugabe. Das bisher vertretene einphasige Modell muß also zugunsten eines anderen, in dem zwei voneinander unabhängige Mechanismen in der Progesteronproduktion und -sekretion wirken, revidiert werden.

Wenn man berücksichtigt, daß die Progesteronsekretion hauptsächlich durch sekretorische Granula gewährleistet ist (HEATHY et al., 1983), könnte die Komponente der je nach Zyklusstadium unterschiedlichen Luteinzellstruktur (GULYAS, 1984) eine eminent wichtige Rolle im Zusammenhang mit Opioideffekten spielen.

2.3.2. Wichtige lokale Regulationsmechanismen in der Progesteronsynthese und -sekretion des Gelbkörpers

2.3.2.1. Katecholaminerge Innervierung und Biogene Amine

Man konnte Opioidrezeptoren in chromaffinen Zellen wie z.B. in der Nebenniere nachweisen (SCHULTZBERG, 1978) und auch die dort parallel erfolgende Ausschüttung endogener Opioidpeptide aus Vesikeln zusammen mit Katecholaminen belegen (CHAMINADE et al., 1983). Andere Autoren vermuteten in diesem Zusammenspiel eine physiologische Interaktion zwischen beiden Substanzen (EIDEN und RUTH, 1982).

Von einer stimulierenden Wirkung biogener Amine auf die Sekretion von Progesteron in bovinen Luteinzellkulturen weiß man seit dem Bericht von RHODES und RANDEL (1982).

WEISS et al. (1982) konnten bei der Ratte eine direkte nervale Kontrolle der Ovarsteroidogenese feststellen. KAWAKAMI et al. (1981) wiesen eine Beteiligung der Ovarinnervation an der Steroidsekretion nach.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Katecholaminwirkung im Ovar gibt es nur wenige Arbeiten. HSUEH et al. (1983) zeigten bei Zugabe primärer Katecholamine einen Anstieg von 3- β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (3- β -HSD) und umgekehrt durch Ausschaltung der Ovarinnervation einen Abfall von 3- β -HSD auf. Dieses ist unter den steroidogenetischen Enzymen der wahrscheinlich wichtigste Vertreter (CAFFREY et al., 1979).

Die bis zu diesem Zeitpunkt bestehenden Kenntnisse in der katecholaminergen Regulation der Ovarfunktion faßt SPICER (1986) in seinem Bericht zusammen.

1987 berichteten BATTISTA et al., daß Noradrenalin (NOR), Adrenalin (A) und Serotonin (5-HT) bei der Progesteronproduktion boviner Gelbkörper in vivo stimulierend wirken. Da sie jedoch keine gleichzeitige Änderung im Serum-LH-Spiegel feststellten, vermuteten sie in Einklang mit In-vitro-Versuchen (CONDON und BLACK, 1976; MILVAE et al., 1983; BATTISTA und CONDON, 1986 b) einen di-

rekten Einfluß dieser biogenen Amine auf den Gelbkörper. Die letztgenannten Autoren fanden zwar kein NOR und A im Corpus luteum (C.l.; BATTISTA und CONDON, 1986a), jedoch 5-HT (BATTISTA und CONDON, 1986b); ob dieses aus Mastzellen oder Blutplättchen stammt bzw. zirkulierendes 5-HT im C.l. lediglich gespeichert oder gar dort synthetisiert wird, konnte nicht geklärt werden.

2.3.2.2. Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels

Bovine Luteinzellen sind nach MILVAE et al. (1986) in der Lage, die wichtigsten Derivate der Arachidonsäure zu synthetisieren. Die Autoren untersuchten die unterschiedlich luteolytisch bzw. luteotroph wirkenden Lipxygenase- und Cyclooxygenaseprodukte dieser Substanz. Das bekannteste ist in diesem Zusammenhang Prostaglandin $F_{2\alpha}$, ein Cyclooxygenaseprodukt, dem eine luteolytische Wirkung in vivo, aber eine luteotrophe Wirkung in vitro zugeschrieben wird (HIXON und HANSEL, 1979).

Ein anderes Produkt der gleichen Enzymspaltung, das Prostaglandin E_2 wirkt hingegen nur luteotroph (HANSEL und DOWD, 1986).

Lipxygenaseprodukte haben ähnlich uneinheitliche Wirkungen auf das Luteingewebe und dessen Progesteronproduktion (MILVAE et al., 1986).

Man kann daraus ersehen, daß komplexe Mechanismen in der Funktion des C.l. vorliegen und selbst den isolierten Zellstoffwechsel in mannigfacher Form beeinflussen können.

2.3.2.3. Steroid-binding-protein

Das Steroid-binding-Protein ist von unbekannter Herkunft. TANAKA et al. (1984) konnten es im luteinisierten Rattenovar nachweisen und stellten fest, daß es in der Aminosäuresequenz dem in der Rattenleber vorkommenden Sterol-carrier-protein₂ entspricht; es soll die intrazelluläre Verteilung des Cholesterols zu den einzelnen Organellen erleichtern und könnte so auch eine Rolle in der Progesteronsynthese des C.l. spielen.

2.3.2.4. Zyklische Nukleotide und Second-messenger-Systeme

Die Progesteronsekretion in bovinen Plazentalzellen - sowohl aus maternalen Karunkeln als auch aus fetalen Kotyledonen - ist Ca^{2+} abhängig und cAMP-unabhängig (SHEMESH et al., 1985).

In Luteinzellen haben Ca-Ionophore keinen Effekt auf die Progesteronsynthese von Zellen jeden Stadiums, jedoch erhöhten sie die Stimulationsfähigkeit durch LH an den Tagen 9-10 (HANSEL und DOWD, 1986); die Autoren schließen daraus, daß zumindest für

einen Luteinzelltyp das Ca-phosphoinositol Protein-Kinase-C Second-messenger-System von Bedeutung ist.

2.3.2.5. Intraovarielle nichtsteroidale Regulatoren

Es wird von vielen Autoren über nichtsteroidale Regulatoren im Ovar berichtet (z.B. ESCH et al., 1983), die auch im Gelbkörper wirken könnten (SHAHA et al., 1984).

Nichtsteroidale Substanzen im C.l., denen eine Regulatorfunktion zukommen könnte, sind z.B. Inhibin (CHANNING, 1979) und das natriuretische Protein aus dem Herzvorhof (atrial natriuretic protein, ANP; VOLLMER et al., 1988).

Die Funktionen dieser Substanzen liegen noch im Dunkeln, jedoch konnte man auch endogene Opioidpeptide im Ovar, speziell im humanen und bovinen Corpus luteum (MENEZO et al., 1987) beobachten.

Das hauptsächlich an ϵ -Rezeptoren, aber an μ - und δ -Rezeptoren ebenso bindende β -Endorphin (POMC-Derivat) wie auch die k -Liganden α -Neoendorphin und Dynorphin A (Proenkephalin-B-Derivate) kommen in Luteinzellen in einer um 10 000-fach höheren Konzentration als in Nervengewebe vor (EHRENREICH et al., 1985). SHAHA et al. (1984) vermuten sogar, daß die β -Endorphinkonzentration im Ovar durch Gonadotropine reguliert werden könnte.

Es besteht noch Unklarheit über Existenz und Lokalisation von Opioidrezeptoren im Gelbkörper bzw. an der Luteinzelle (SCHULZ, 1987). Ein Zusammenhang zwischen diesen und den nachgewiesenen Opioidpeptiden in der Beeinflussung der lutealen Funktion konnte noch nicht beschrieben werden.

Das führte zur Überlegung diesen Zusammenhang mittels kontrollierter Zugabe exogener Opiode in einem geschlossenen System zu beleuchten. Es wird davon ausgegangen, daß durch schwankende Konzentrationen und unterschiedliche Anwesenheitsdauer von Opioiden ein Effekt simuliert werden kann, der sich in einer Änderung der Progesteronausschüttung bemerkbar macht.

In den im folgenden beschriebenen Versuchen soll daher, trotz der vielschichtigen Problematik, der Frage nachgegangen werden, ob sich anhand der Progesteronmessung im Kulturmedium angezüchteter Luteinzellen ein durch Opioidzugabe verursachter Einfluß auf die luteale Progesteronsekretion darstellen läßt.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

Für die In-vitro-Untersuchungen der Progesteronsekretion wurden insgesamt 47 Gelbkörper herangezogen.

Die Entnahme der Gelbkörper erfolgte aus am Schlachthof München zur regulären Schlachtung anstehenden Kühen und Färsen der Rasse "Deutsches Fleckvieh"; die Tiere wiesen keine makroskopisch erkennbaren pathologischen Veränderungen am inneren Genitale auf.

Durch Palpation der im Schlachtkörper hängenden Gebärmutter und deren anschließende Kontrolle durch Öffnen konnten 14 Corpora lutea periodica von 23 C.l. graviditates unterschieden werden. An Hand von Scheitel-Steiß-Längen der Früchte, welche weniger als 13 cm betrugen, konnten 17 Trächtigkeitsgelbkörper der Frühgraviditätsphase zugeordnet werden.

Eine Klassifizierung der C.l. periodica nach Zyklusstadien erfolgte im Labor.

3.2. Methode

Die Gewinnung der Gelbkörper und deren Verarbeitung zu einer aus-

saatfähigen Zellsuspension wurde von STOCK (1984) übernommen und wie folgt modifiziert.

3.2.1. Gewinnung der Gelbkörper

Die Eierstöcke, auf denen sich Gelbkörper befanden, wurden mit sterilen Handschuhen und Instrumenten unmittelbar nach der Tötung aus den Schlachtkörpern entnommen. Noch im Schlachthof erfolgte unter möglichst keimfreien Kautelen die Entfernung des äußeren serösen Ovarüberzugs und die Trennung der Corpora lutea vom Eierstocksgewebe. Die Gelbkörper wurden dann in 70%igem Alkohol gewaschen und kurz abgeflammt. Sofort anschließend wurden sie in eisgekühlte balancierte Salzlösung (BSS) mit 5-fachem Antibiotikazusatz (s. 3.2.2.1) verbracht und in einem Thermosgefäß weitertransportiert.

3.2.2. Verarbeitung zu aussaatfähiger Zellsuspension

3.2.2.1. Nährmedien und Enzymlösungen

Verwendung fanden folgende Substanzen und Lösungen:

- a. Antibiotika-/Antimykotikalösung (AB-/AM-Lösung) für Zellkulturen (Fa. Sigma Chemicals, St. Louis; Kat.-Nr. A-9909, 1988).

b. Balanced salt solution (BSS): Die Lösung wurde frisch angesetzt und enthielt ad 1000 ml Aqua bidest.:

8,0	g	NaCl
0,2	g	KCl
1,0	g	NaHCO ₃
2,0	g	Glucose
4,77	g	HEPES-Puffer
10,0	ml	0,1%ige Phenolrotlösung
50,0	ml	AB-/AM-Lösung (5-fache BSS)
bzw. 10,0	ml	AB-/AM-Lösung (1-fache BSS)

c. Hyaluronidase-/Collagenaselösung: 100 ml BSS-1-fach enthielten:

0,125	g	Hyaluronidase, gewonnen aus Bullenhoden (Fa. Sigma Chemicals, St. Louis; Kat.-Nr. H-3506, 1988)
0,125	g	Collagenase 'Worthington' (125 U/mg; Fa. Seromed, Berlin; Kat.-Nr. C II-22, 1987)
3,0	g	Bovines Serumalbumin (s.u.).

d. Pankreatin (Viokase; Fa. Gibco Europe, Wiesbaden, Kat.-Nr. 061-5725 D, 1987) als 0,25%ige Lösung in BSS-1-fach suspendiert.

e. Pferdeserum (Fa. Sigma Chemicals, St. Louis; Kat.-Nr. H-1138, 1988).

- f. Medium 199 (M 199; Fa. Gibco Europe, Wiesbaden; Kat.-Nr. 079-0011, 1987): Das Trockenpulver wurde unter Zusatz von 2,2 g NaHCO_3 und 10 ml AB-/AM-Lösung in 1000 ml Aqua bidest. frisch angesetzt.
- g. Bovines Serumalbumin (Fa. Sigma Chemicals, St. Louis; Kat.-Nr. A-9647, 1988)
- h. Suspensionsmedium zur Aufnahme des aus dem Dispergierungsvorgang gewonnenen Zellmaterials (M 199 + 10% Pferdeserum + 3% bovines Serumalbumin).
- i. Desoxyribonuclease I (DNase; Fa. Sigma Chemicals, St. Louis; Kat.-Nr. D-0876, 1987) wurde als 0,005%ige Lösung in M 199 frisch angesetzt.
- k. Serumhaltiges Inkubationsmedium (M 199 + 10% Pferdeserum).

3.2.2.2. Mechanische Zerkleinerung

Alle anschließenden Arbeitsvorgänge fanden im Zelllabor unter einer Laminar Flow Bank statt.

Vor der mechanischen Zerkleinerung wurden die C.l. periodica an Hand ihrer Farbe, Konsistenz, ihres Volumens und ihrer "Pilzhöhe" in vier Entwicklungsstadien eingeteilt (Tab. 3).

Tabelle 3: Bestimmung des Entwicklungsstadiums von Corpora lutea anhand makroskopischer Befunde (Okuda, 1982).

Kriterium	Entwicklungsstadien			
	Anbildung		Blüte	Rückbildung
	früh I	spät II	III	IV
Farbe	braunrot	dunkelrot	rotgelb	gelb
Konsistenz *	1	2	3	4-5
Volumen (cm ³)	<3	≥3	>5	≤5
Pilzhöhe (cm)	<1	≥1	>1	≤1

* Konsistenzgrade:

- 1 : sehr weich, Gewebe mit den Fingern zerdrückbar
- 2 : weich, Gewebe mit dem Skalpellrücken zerdrückbar
- 3 : fest-elastisch, Gewebe sehr leicht schneidbar
- 4 : fest, Gewebe leicht schneidbar
- 5 : derb, Gewebe weniger leicht schneidbar

Zur Weiterverarbeitung der Gelbkörper wurde mit einer kleinen Schere die bindegewebige Schicht der Oberfläche abgetragen und verworfen. Das Luteingewebe wurde dann mit einem Skalpell in ca. 1 mm dicke Scheiben und diese dann auf einem Gewebeschnidegerät (Fa. The Mickle Laboratory Engineering, Gownshall) in Würfel mit 1 mm Kantenlänge geschnitten.

Vor der enzymatischen Dispergierung wurde das Luteingewebe zweimal mit 1-facher BSS gewaschen und im Wasserbad bei +35°C für 15 Min. vorinkubiert. Dabei wurde das Gewebe durch ein Rührgerät mit silikonisierten Plastikstäben (90-120 Umdrehungen pro Minute) am Absetzen gehindert.

3.2.2.3. Enzymatische Dispergierung

Nach nochmaligem Waschen des vorinkubierten Luteingewebes mit BSS wurde die Hyaluronidase-Collagenase-Lösung zur Vorverdauung hinzugefügt und bei +35°C für 45-75 Min. gerührt. Als Kriterien der ausreichenden Vorverdauung dienten die glasig-flattrigen Schnittkanten der Gewebewürfel und eine eindeutige Trübung der Lösung.

Nach dieser ersten Dispergierung wurde die Flüssigkeit, die über den sich absetzenden Gewebeteilen stehenblieb, abgehebert. Es folgte eine Voruntersuchung unter einem Mikroskop mit inverser Beleuchtung, um den Verunreinigungsgrad und Prozentsatz schon gelöster Luteinzellen zu ermitteln. Da dieser Überstand nicht weiterzuverarbeiten war, konnte er anschließend verworfen werden.

Je nach Menge störenden Fremdmaterials wurde die Gewebefraktion mehrmals gewaschen, danach mit der 0,25%igen Pankreatinlösung versetzt und bei +35°C gerührt. 10-15 Minuten später wurde der Vorgang unterbrochen, der flüssige Überstand mit den gelösten Luteinzellen in ein Gefäß mit Suspensionsmedium verbracht und im Kühlschrank aufbewahrt. Das Luteingewebe wurde mit frischer Pankreatinlösung versetzt und nochmals für 10-15 Min. im Wasserbad gerührt.

Dieser Dispergierungsschritt wiederholte sich fünf bis siebenmal, wenn der Zellgehalt bei der mikroskopischen Voruntersuchung schon hoch war und auf leicht verdaubares Gewebe deutete. Mehr als sie-

ben Dispergierungsschritte waren nur bei schwer aufzulösendem Gewebe notwendig, um ausreichend Zellmaterial zu erhalten.

Die gesammelte Zellsuspension wurde durch Filtration mit einem sterilisierten Drahtsieb (Maschenweite 1 mm) von groben, nicht verdauten Gewebefetzen gereinigt und anschließend insgesamt dreimal bei + 4°C und 760 rpm (rounds per minute; entspricht 100 g) zentrifugiert; die dabei erhaltenen Überstände wurden jeweils verworfen. Die ersten beiden nach dem Zentrifugieren erhaltenen Pellets wurden mit der DNase-Lösung resuspendiert, um damit noch verbliebene Zellklumpen aufzulösen. Das letzte Pellet wurde mit 9,9 ml serumhaltigen Mediums resuspendiert.

3.2.2.4. Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung

Eine Probe (100 μ l) der nun vorliegenden Zellsuspension wurde mit 50 μ l 0,1%iger Trypanblaulösung zur Anfärbung toter Zellen versetzt. Mit der Suspension wurde die Zelldichte in einer Zählkammer nach TÜRCK (Kammerhöhe 0,1 mm, Feldfläche 0,5 x 0,5 mm) bestimmt.

In 64 großen Feldern wurden neben den lebenden die angefärbten toten Zellen ausgezählt. Die Vitalitätsrate des gewonnenen Zellmaterials errechnete sich über den Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Zelldichte (D) vitaler Zellen pro mm^3 ($=\mu\text{l}$) ergab sich aus folgender Formel:

$$D = \frac{\text{Zellzahl vitaler Zellen}}{64} \times 10 \times 25 \times 1,5 *$$

* Verdünnungsfaktor; muß eingesetzt werden, da zu 100 µl der Zellsuspension 50 µl Trypanblaulösung zugefügt werden.

Die Gesamtzahl der lebenden Zellen (G) in der Zellsuspension (9,9 ml) wurde mit D ermittelt:

$$G = D \times 1000 \times 9,9$$

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde als Grundlage für die Berechnung des Zellgehalts in der aussaatfähigen Zellsuspension herangezogen. Sie wurde zur Aussaat auf einen Zellgehalt von 50 000 Zellen pro Kultur mit serumhaltigem Medium verdünnt.

Von einem Gelbkörper standen zwischen 10 und 30 Millionen Zellen zur Verfügung. Mit den Zellsuspensionen konnten so 200 bis 600 Kulturen angelegt werden.

3.2.3. Aussaat und Inkubation

Vor der Aussaat schien es angebracht, eine 96-wells-Platte (Nunc; Fa. Nunc, Kamstrup, Dänemark) mit je 150 µl serumhaltigem Medium 199 pro Kulturvertiefung für 15 - 20 Min. im Brutschrank vorzuinkubieren. Damit sollte eine verlängerte Adaptationszeit bis zum Erreichen eines stabilen Kultivierungsmilieus vermieden werden.

Während der Aussaat verhinderte dreidimensionales Schütteln des Glasgefäßes mit der Zelllösung auf einem Tischmixer (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) das Absetzen von Zellen auf dem Gefäßboden.

Mit Multipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg) wurden pro Kultur 50 μ l Zellsuspension auf die im Brutschrank mit serumhaltigem Medium vorinkubierten Kulturplatten verbracht.

3.2.3.1. Inkubation der Zellkulturen mit serumhaltigem Medium

Bei 96% Luftfeuchtigkeit, einem CO₂-Gehalt von 6% und bei 37°C wurden alle Kulturen zunächst für 12 Stunden mit serumhaltigem Medium im Brutschrank inkubiert.

3.2.3.2. Serumfreies Medium

Nach 12-stündiger Inkubation mit Serum wurde der Überstand verworfen und der nun angewachsene Zellrasen mit M 199 gewaschen.

Um ein Bild über die Wachstumsart des Zellrasens bzw. den Zelltyp der Luteinzellen zu bekommen, wurden zu diesem Kultivierungszeitpunkt stichprobenartig mikroskopische Untersuchungen der Kulturen durchgeführt.

Anschließend wurde serumfreies M 199 auf die Kultur gegeben und je nach Versuchsansatz das freibleibende Volumen auf den Gesamtkulturüberstand zur Zugabe von entsprechend verdünnten Testsubstanzen genutzt.

3.2.4. Einsatz von Substanzen in der bovinen Luteinzellkultur

Ziel der Arbeit war es, neben dem vermuteten Einfluß auf die Basalsekretion eine eventuelle Modulation der stimulierten Progesteronsekretion von kultivierten bovinen Luteinzellen durch Opiode aufzuzeigen. Voraussetzung dafür war die Verwendung einer standardisierten Stimulation, um die Versuchsanordnung nicht durch Inkaufnahme unbekannter Faktoren in Frage zu stellen.

3.2.4.1. Verwendung eines LH-Agonisten zur Stimulation der Progesteronsekretion

Die Stimulierung der Luteinzellen erfolgte mit einem LH-Agonisten. Als Präparat zur Herstellung von Verdünnungsreihen diente ein in M 199 gelöstes humanes Choriongonadotropin (hCG; Ekluton®, Fa. Vemie, Kempen).

Im Versuchsdesign konnten somit zwei unterschiedliche Fragestellungen im gleichen Experiment berücksichtigt werden. Zum einen war es möglich, auf einer Kulturplatte zwei verschiedene Testsubstanzen in jeweils drei Konzentrationen bei gleichzeitiger hCG-Stimulation im dreifachen Ansatz zu überprüfen. Alternativ ließen sich zwei unterschiedliche Inkubationszeiträume (s. 3.2.5.) auf einer Kulturplatte bearbeiten (Abb. 4).

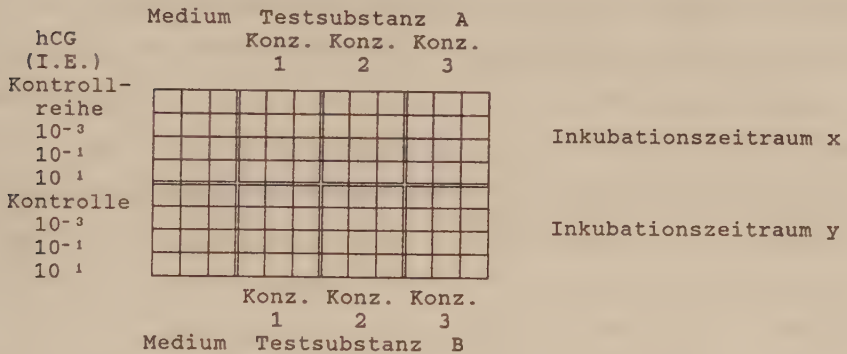


Abb. 4: Kulturplattenschema der Behandlung von unstimulierten oder stimulierten Luteinzellkulturen mit Testsubstanzen bzw. in unterschiedlichen Inkubationszeiträumen.

In Vorversuchen wurde eine Stimulationsreihe mit 7 Stufen eingesetzt, um die Anwendbarkeit von nur 3 Konzentrationen zu belegen.

3.2.4.2. Einsatz von Opioiden in der Luteinzellkultur

Insgesamt wurden vier Testsubstanzen, drei Opioidagonisten und ein Opioidantagonist in den Versuchen verwendet.

3.2.4.2.1. Beschreibung der einzelnen Substanzen

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Opioiden und deren wichtigste Charakteristika (Tab. 4).

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Opioiden.

Liganden- bezeichnung	Chemische Kurz- bezeichnung	Funktion	K _d - Wert (nM)
μ-Ligand	Fentanyl-dihydrogen-citrat	Agonist	5
δ-Ligand	D-Ala ² -D-Leu ⁵ -Enkephalin- AcOH ₂ -H ₂ O	Agonist	0,5
κ-Ligand	U-50 488 H *	Agonist	3
	Naloxon	Antagonist	10

* Trans-(+)-3,4,dichloro-N-methyl-N-(2-(1-pyrrolidinyl)
cyclohexyl)benzen-acetamide-methanesulfonatehydrate (SCHULZ, 1988)

3.2.4.2.2. Standardisierung

Als Anhaltspunkt bei der Wahl der Konzentrationen für die Liganden wurde der K_d -Wert genommen. Dieser Wert ist ein Maß für die Affinität eines Liganden zu seinen Rezeptoren und gibt die Konzentration des Liganden an, bei der 50% der Substanz dissoziiert vorliegen.

Aus einer Stammlösung der Liganden von je 10^{-5} M wurden Verdünnungsreihen hergestellt und die Verdünnungen so gewählt, daß μ - und κ -Ligand in Konzentrationen von 10^{-8} ; 10^{-9} und 10^{-10} M pro Kultur, der δ -Ligand in den Stufen 10^{-9} ; 10^{-10} und 10^{-11} M pro Kultur und Naloxon als Lösung von 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} und 10^{-9} M pro Kultur verabreicht werden konnten.

3.2.5. Inkubationszeiträume

Im maximal 12 Stunden dauernden Inkubationszeitraum, aus dem die Kulturüberstände auf ihren Progesterongehalt geprüft wurden, wurde nach folgendem Schema variiert:

I. Inkubationszeiträume ohne Medienwechsel: nach 3-, 6-, 9- und 12-stündiger Inkubation mit der Testsubstanz (Opioid) wurde der Überstand zur Progesteronbestimmung gewonnen.

II. Inkubationszeiträume mit Medienwechsel

- a) Nach 3-, 6- und 9-stündiger Inkubation mit der Testsubstanz wurde der Überstand verworfen, die Kultur mit frischem Medium ohne Testsubstanz versetzt und nach insgesamt 12-stündiger Inkubation der Überstand zur Progesteronbestimmung gewonnen.
- b) Nach 3-, 6- und 9-stündiger Inkubation mit Medium ohne Testsubstanz wurde der Überstand verworfen, der Kultur frisches Medium mit Testsubstanz zugefügt und nach insgesamt 12-stündiger Inkubation der Überstand zur Progesteronbestimmung gewonnen.

3.2.6. Entnahme und Aufbewahrung des Kulturüberstandes sowie Aufbewahrung des Zellrasens

Der Kulturüberstand wurde mit einer Pipette gewonnen und einzeln oder gepoolt (aus 3 bzw. 6 Kulturen) in Reagenzröhrchen bei -20°C bis zur Progesteronbestimmung aufbewahrt.

Der Luteinzellrasen in den Kulturvertiefungen wurde vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann bei -20°C tiefgefroren.

3.2.7. Progesteronmessung im Kulturüberstand

3.2.7.1. Verfahren

Zur Anwendung kam der Enzymimmunoschnelltest "Enzygnost[®]" für Serumprogesteron der Fa. Hoechst-Veterinär, Frankfurt.

Das Nachweisprinzip dieses Schnelltests beruht auf einer kompetitiven Bindung zwischen mit alkalischer Phosphatase markiertem Progesteron und unmarkiertem Progesteron der Probe an monoklonale Antikörper, die in Mäusen gegen Progesteron erzeugt worden sind. Die Konzentration des Progesterons aus der Probe ist also umgekehrt proportional zur bekannten Konzentration markierten Progesterons.

Der verwendete Schnelltest arbeitet beim Nachweis dieses Progesteron-Enzym-Komplexes mit einem Verstärkersystem. Dabei ist das mittels der alkalischen Phosphatase aus einem Substrat abgespaltene NAD⁺ erstes Glied eines spezifischen Redoxzyklus zur Entwicklung eines Formazan-Farbstoffes. Dieser ist in Abhängigkeit von der Progesteronkonzentration unterschiedlich intensiv und dient anhand seiner optischen Dichte, die unter einem Photometer bestimmt wird, zur quantitativen Bestimmung.

Die monoklonalen Antikörper der Maus (IgG mit einer Affinität zu Progesteron von mehr als 10^9 l mol^{-1}) zeigen Kreuzreaktionen mit 5- α -Pregnan-3- α -ol-11,20-dione von 14,7 %, mit 17- α -Progesteron von 3 % und mit 11- α -Progesteron von 27 %, wobei die Reaktivität zu Progesteron mit 100 % definiert ist (STANLEY et al., 1985).

3.2.7.2. Vorversuche zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Enzymimmunotests (EIA)

Der Progesterongehalt im Überstand von Luteinzellkulturen übersteigt bei Weitem die Konzentrationen, die normalerweise in Blutplasma bzw. -serum vorliegen; diese jedoch dienen den herkömmlichen Schnelltests als Richtlinie für ihre Standardkurven.

Damit der Enzymimmunoschnelltest (Enzygnost[®]-Serum) für Luteinzellkulturüberstände verwendbar war, mußte durch Probenverdünnung die Progesteronkonzentration dem vorgegebenen Standardkurvenbe-

reich des Tests angepaßt werden.

Zudem schien es wünschenswert, den sensibelsten Bereich der Kurve zu nutzen, da in diesem, bei Meßwerten bis 5 ng/ml, die durch teilweise hohe Verdünnungen kaschierten Schwankungen des Progesterongehalts in den Proben am ehesten erfaßt werden konnten.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Enzygnost® konnten die folgenden Parameter erhoben werden (Tab. 5). Als Meßproben fanden verschieden verdünnte Kulturüberstände Verwendung.

Tabelle 5: Statistische Parameter zur Erfassung der Reproduzierbarkeit des Enzygnost®.

	R ² (Regression)	Korrelations- koeffizient	Irrtums- wahrscheinlichkeit
Interassay	0,886	0,941	0,05 < p ≤ 0.1
Intraassay	0,925	1	0,1 < p ≤ 0,375

Als Maßstab für die Genauigkeit des Enzygnost® diene die Wiederfindung bekannter Progesteronmengen im Test, die in der folgenden Abbildung in Regression auf ihre Meßwerte dargestellt ist (Abb. 5).

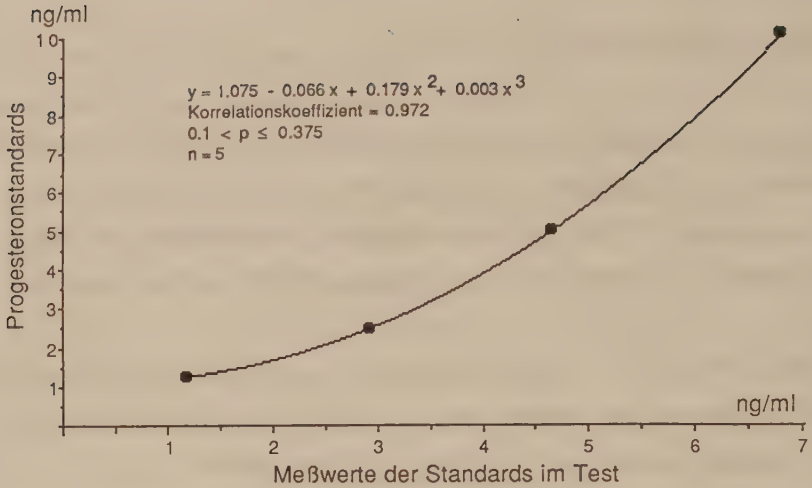


Abb. 5: Regression von vier Progesteronstandards (1,25; 2,5; 5 und 10 ng/ml) auf die mit ihnen in fünf verschiedenen Testansätzen gemessenen Progesteronkonzentrationen.

3.2.7.3. Standardisierung

Für jeden Probenblock, bei dem durch gleiche Versuchsanordnung ähnliche Progesteronwerte zu erwarten waren, wurde an mindestens drei Stichproben die günstigste Verdünnung zwischen 1:20 und 1:400 in einem Vorversuch ermittelt. Diese Proben lagen dabei jeweils in drei Verdünnungsstufen vor.

Sowohl im Vorversuch als auch bei der Probenbestimmung wurden die Proben in Medium 199 mit einem Digital-Diluter (Fa. Hamilton, Darmstadt) verdünnt.

3.2.8. Bestimmung des Gehalts an β -Endorphin und Protein im Zellkulturrasen *

3.2.8.1. Proteinbestimmung im Zellrasen

Die Zellen wurden mit 1 M Essigsäure aus den Kulturvertiefungen herausgelöst und der in der Inkubation vorgenommenen Behandlung entsprechend gepoolt.

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit einem Test-Kit der Fa. Bio-Rad (Verfahren nach BRADFORD, 1976), wobei in der Standardkurve Proteinkonzentrationen von 1 bis 25 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurden.

* Für die Durchführung der Bestimmungen bedanke ich mich bei Frau Dr. L. Nice, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät München.

3.2.8.2. β -Endorphinbestimmung im Zellrasen

Die Zellen wurden mit Essigsäure von ihrer Unterlage abgelöst (s.o.).

Nach Einstellung des pH auf 2,9 lief die Lösung durch einen Ionenaustauscher (Partikelgröße 200-400 mesh; Fa. Bio-Rex); mit 1 M Essigsäure in Methanol wurde das Eluat verdünnt. Nach Lyophilisation wurde in 0,1%iger Trifluoressigsäure resuspendiert und das Solvens durch ein reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) geschickt.

Für jede einzelne Fraktion wurden anschließend β -Endorphinbestimmungen mit einem Radioimmunoassay (RIA) vorgenommen.

Der für den RIA verwendete Mäuseantikörper ("Costy") wurde gegen β -Endorphin-(1-31) erzeugt und bindet am Carboxylterminal des Endorphinmoleküls. Eine Kreuzreaktion mit τ -Endorphin-(1-17) scheint möglich, ist jedoch nicht berücksichtigt worden.

3.2.9. Statistische Auswertung

Bei den statistischen Untersuchungen kamen die Varianzanalyse des Programmpakets SPSS-X Version 2.2 (SPSS Inc., 1986), der Student's t-Test und Regressions- bzw. Korrelationsberechnungen (Weber, 1980) zur Anwendung.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Die Kultivierung von Luteinzellen unterschiedlicher Gelbkörperstadien

Von den 47 am Schlachthof gewonnenen Gelbkörpern waren nach der Dispergierung 40 anzüchtbar. 33 Zellkulturen waren nach der Inkubation mit serumhaltigen Medium aufgrund des dichten Zellrasens dazu geeignet, als Versuchskulturen für die Opioido zu dienen.

Aus der Tabelle 6 sind die Vitalitäten der Luteinzellen nach den Dispergierungen sowie das Volumen der aussaatfähigen Suspension in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des verwendeten Gelbkörpers ersichtlich.

Tabelle 6: Prozentuale Anteile lebender Luteinzellen an der Gesamtzahl der gewonnenen Zellen (Vitalität) und Volumina der aussaatfähigen Zellsuspensionen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Gelbkörpers.

Stadium des Gelbkörpers	Anzahl	Vitalität der dispergierten Zellen in % ($\bar{x} \pm s$)	Zellsusp.-Volumen in ml bei Zellkonzentration von 50 000 / 50 μ l ($\bar{x} \pm s$)
Anbildung			
- früh	3	84,5 $\pm$ 3,9	18,2 $\pm$ 8,5
- spät	3	76,9 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 6,4
Blüte	8	75,4 $\pm$ 6,6	8,9 $\pm$ 11,5
Rückbildung	1	69,0	5,2
C.1. gravid.			
- früh	17	77,8 $\pm$ 5,3	37,9 $\pm$ 22,0
- spät	8	73,9 $\pm$ 9,6	29,3 $\pm$ 22,5

Von den Gelbkörpern der frühen Anbildung konnten die höchsten Anteile vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl gewonnen werden. Mit fortschreitender Zyklusdauer nahmen die Vitalitäten jedoch allmählich ab; aus der Rückbildung konnte nur ein Gelbkörper nach der Dispergierung kultiviert werden; nach Inkubation mit serumhaltigem Medium zeigte der Zellrasen kein gleichmäßiges Wachstum.

Ob dafür die niedrige Vitalität bzw. die geringe Zellausbeute oder ein methodischer Fehler verantwortlich gemacht werden sollte, war unerheblich, da in der Tendenz beide erstgenannten Kriterien gegen eine befriedigende Kultivierung als Bioassay sprachen.

Genauso konnten auch bei den C.l. graviditates mit zunehmendem Trächtigkeitsstadium eine abnehmende Vitalität und eine geringere Zellausbeute festgestellt werden.

Im Vergleich aller angezüchteten Gelbkörper haben die jungen Zellen der Anbildung zwar den größten Anteil lebender Zellen, aber die weitaus größte Zellausbeute pro dispergiertem Gelbkörper wurde bei C.l. der ersten Trächtigkeitsmonate erreicht.

3.3.2. Stimulierbarkeit kultivierter Luteinzellen durch hCG

Nach der Inkubation mit serumhaltigem Medium wurden die Kulturen für 12 Stunden mit einer aufsteigenden hCG-Verdünnung versetzt. Um eine dosisabhängige Stimulationsfähigkeit der angezüchteten

Gelbkörperzellen aufzeigen zu können, mußten zwei verschiedene Arten der Versuchsauswertung angewandt werden.

Aus Ansätzen des gleichen Versuchs wurden zunächst die Absolutwerte des gemessenen Progesterons dazu benutzt, sie direkt miteinander zu vergleichen (Abb. 6).

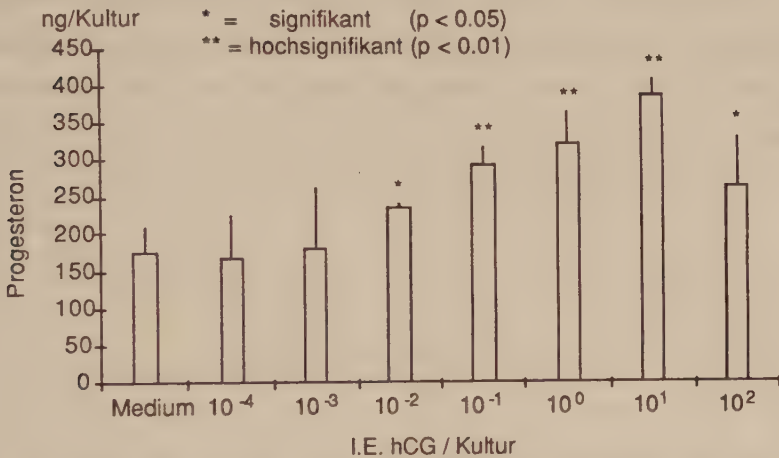


Abb. 6: Stimulationsfähigkeit der bovinen Luteinzellkultur; Inkubationszeit 12 Stunden; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. Jeder Einzelwert stammt aus der Messung 4 gepoolter Kulturen des gleichen Ansatzes. Im t-Test wurden die stimulierten Gruppen mit der Kontrollgruppe (= Medium) verglichen.

Die zweite Versuchsauswertung berücksichtigt die Schwankungen in den Absolutwerten unabhängiger, aber unter gleichen Bedingungen durchgeführter Kulturansätze. Um sie dennoch in ihrer Stimulationsfähigkeit miteinander vergleichen zu können, mußte die Sekretionsleistung relativ zur Kontrollkultur gesetzt werden. Dazu wurde ein Verhältniswert errechnet aus dem Progesteronwert der

stimulierten Kultur und der unstimulierten Vergleichsprobe (=Kontrolle). Die Kontrolle ist dabei gleich 1,0 gesetzt und dient so als Maßstab für die Progesteronabsonderung stimulierter Zellkulturen.

Diese im Text weiterhin Sekretionsindices genannten Parameter sind in der Abbildung 7 in einer Regression auf die hCG-Stufen angetragen worden. Es wurden die Progesteronabsolutwerte von 27 verschiedenen Stimulationsreihen aus 19 unterschiedlichen Versuchen verwendet.

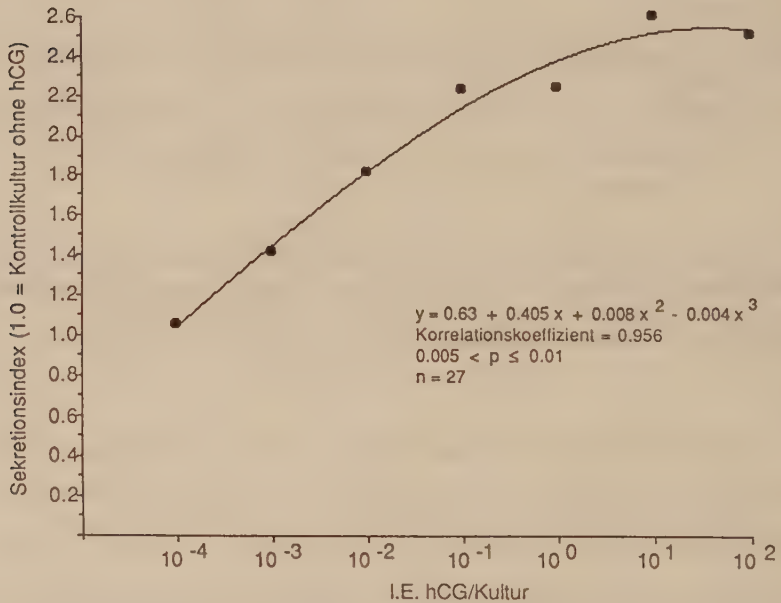


Abb. 7: Regression von Sekretionsindices kultivierter Luteinzellen auf eine hCG-Stimulationsreihe mit ansteigenden Konzentrationen (Inkubationszeit 12 Stunden).

$$\text{Sekretionsindex} = \frac{\text{Progesteronwert der stimulierten Kultur}}{\text{Progesteronwert der unstimulierten Kultur}}$$

Im t-Test konnten mit Ausnahme der Stimulation bei 10^{-4} I.E. hCG (Differenz zur Kontrolle : $p < 0,05$) bei allen Stimulationsstufen statistisch hochsignifikante Differenzen ($p < 0,01$) zur Kontrollkultur belegt werden.

Durch beide Auswertungen läßt sich ein deutlicher Anstieg der Progesteronsekretion bei den mittleren hCG-Stufen aufzeigen. Das ausgeprägte Plateau der niedrigen Stimulationen in der Auswertung von Absolutwerten ist in der Regressionsgerade nicht zu sehen. Jedoch ist beiden Darstellungen die höchste Sekretionsleistung bei 10^1 I.E. hCG/Kultur sowie der Abfall in der nächsten Stufe zu entnehmen.

3.3.3. Zugabe von Opioiden

Im experimentellen Einsatz von Opioiden in der Luteinzellkultur sollten an Hand des Progesterongehalts im Kulturüberstand folgende Fragestellungen überprüft werden:

- a. Gibt es einen opioidergen Einfluß auf die basale Progesteronsekretion ?
- b. Wird das Sekretionsmuster bei hCG-Stimulation durch Opioidliganden verändert ?
- c. Ist eine eventuelle Wirkung der Opioidliganden auf die basale bzw. stimulierte Sekretion abhängig von der Dauer ihrer Anwesenheit ?

3.3.3.1. Einfluß von Opioiden auf die Basalsekretion

In der ersten Versuchsreihe wurde jeweils ein Opioidligand zu unstimulierten Kulturen zugegeben. Pro Ligand wurden 3 Konzentrationen angewandt und die Kulturen 12 Stunden unter Opioidwirkung belassen.

In den Experimenten, die für diese Fragestellung angelegt worden sind, liegen die Basalsekretionen nach Ligandenzugabe unter den Werten der Kontrollkulturen (Abb. 8-10).

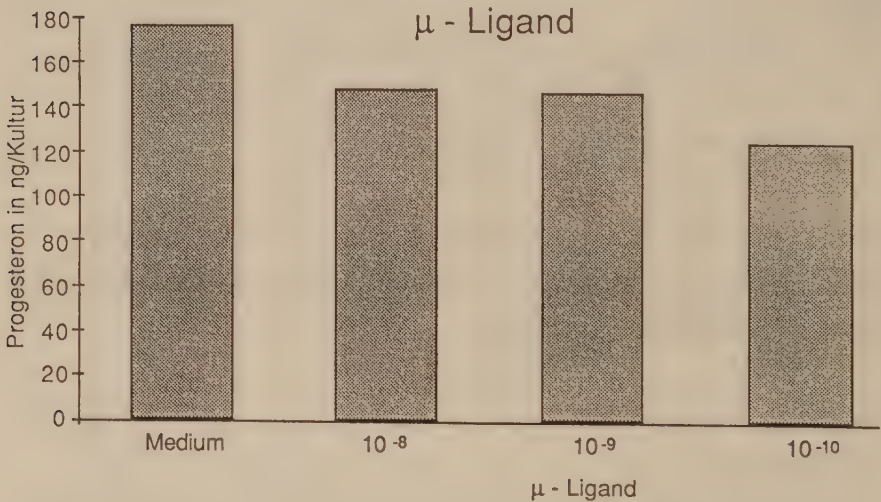


Abb. 8: Basale Progesteronsekretion nach Behandlung mit einem Opioidliganden (μ -Ligand); Inkubationszeit 12 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 6 gepoolten Kulturüberständen eines Versuchs.

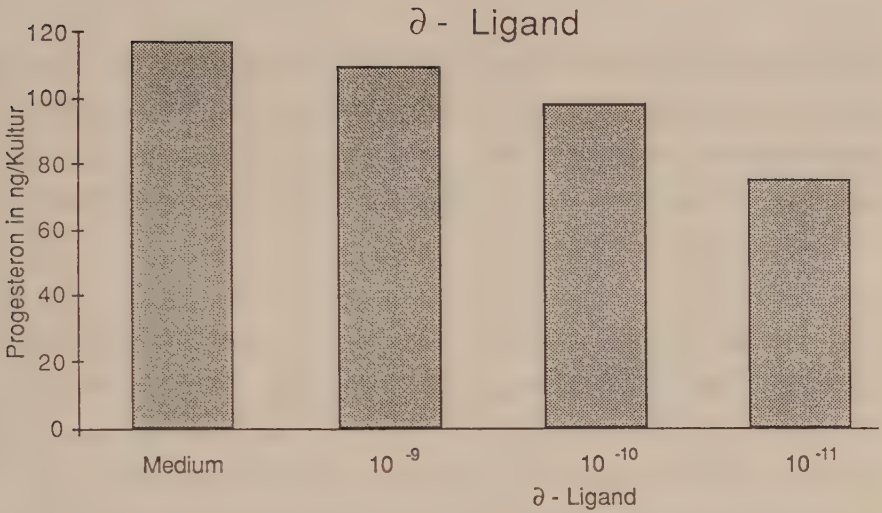


Abb. 9: Basale Progesteronsekretion nach Behandlung mit einem Opioidliganden (δ -Ligand); Inkubationszeit 12 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 6 gepoolten Kulturüberständen eines Versuchs.

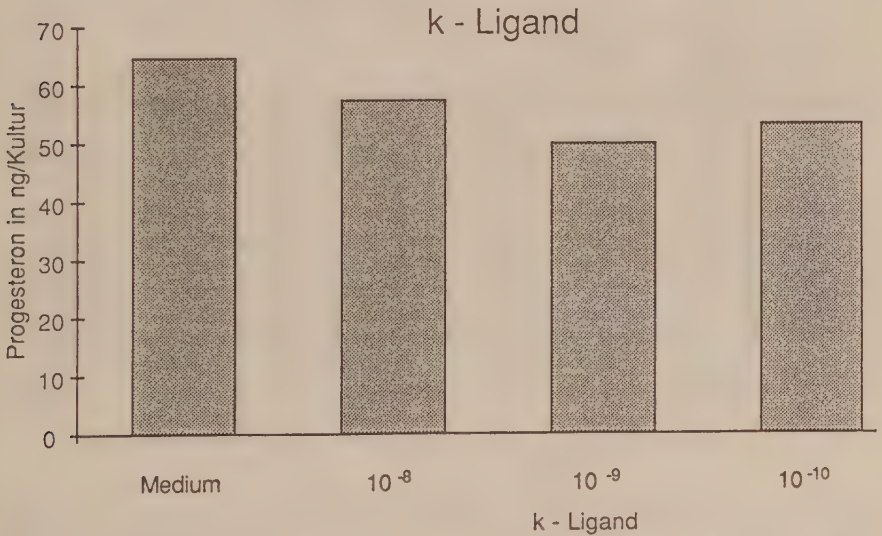


Abb. 10: Basale Progesteronsekretion nach Behandlung mit einem Opioidliganden (κ -Ligand); Inkubationszeit 12 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 6 gepoolten Kulturüberständen eines Versuchs.

Eine Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden läßt sich nur beim δ -Liganden erkennen, der mit zunehmender Konzentration eine geringere Sekretionshemmung bewirkt. Die beiden anderen Liganden zeigen in allen Konzentrationen eine gleichmäßige Dämpfung der Progesteronausschüttung.

In diesem Rahmen wurde außerdem mittels relativer Sekretionsleistungen der Test- zu den jeweiligen Vergleichskulturen deren Regression auf die Konzentrationen der einzelnen Liganden erstellt. Es ließ sich kein Zusammenhang erkennen zwischen der Höhe der Ligandenkonzentration und der Sekretionsleistung behandelter Kulturen (Korrelationskoeffizienten : 0,1 für den μ -, 0,37 für den k- und 0,42 für den δ -Liganden).

3.3.3.2. Einfluß von Opioiden auf die stimulierte Progesteronsekretion bei 12-stündiger Inkubation

Die Kulturen je eines Versuchs wurden mit sieben hCG-Konzentrationen stimuliert und gleichzeitig mit jeweils einem Opioidliganden in drei Konzentrationen behandelt. Der Inkubationszeitraum betrug 12 Stunden.

Wie aus den Abbildungen 11-13 zu ersehen ist, treten sowohl der μ - als auch der κ -Ligand in allen hCG-Stimulationsstufen nicht auffällig sekretionsverändernd auf; zwar liegen die Kontrollwerte in Abb. 11 (μ) konstant über denen der mit Opioiden behandelten Kulturen, die Absolutwerte liegen jedoch nahe beieinander. Die Behandlung mit dem κ -Liganden ergibt aufgrund der nicht gleichmäßig anschlagenden hCG-Stimulation kein klares Bild, es läßt sich aber im Profil der Progesteronwerte die erwartete hCG-Dosisabhängigkeit erkennen.

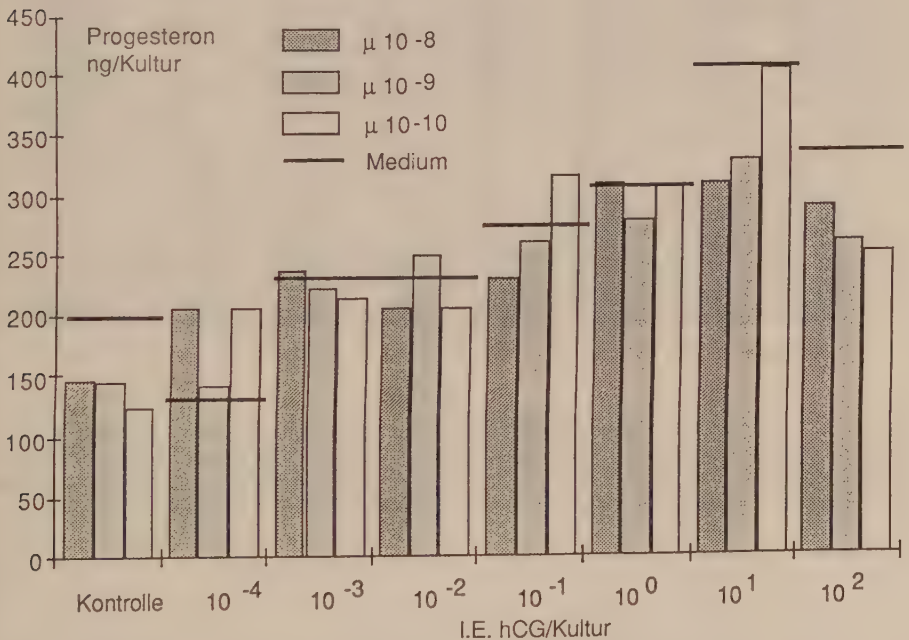


Abb. 11: Wirkung eines Opioidliganden (μ -Ligand) auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion in der Luteinzellkultur; Inkubationszeit 12 Stunden. Jeder aufgetragene Wert entspricht einer Messung aus 3 gepoolten Kulturen des gleichen Versuchs.

Die Zugabe des δ -Liganden bewirkt, vor allem in Kulturen mit hoher hCG-Simulation, einen deutlichen Abfall gegenüber den Kontrollen.

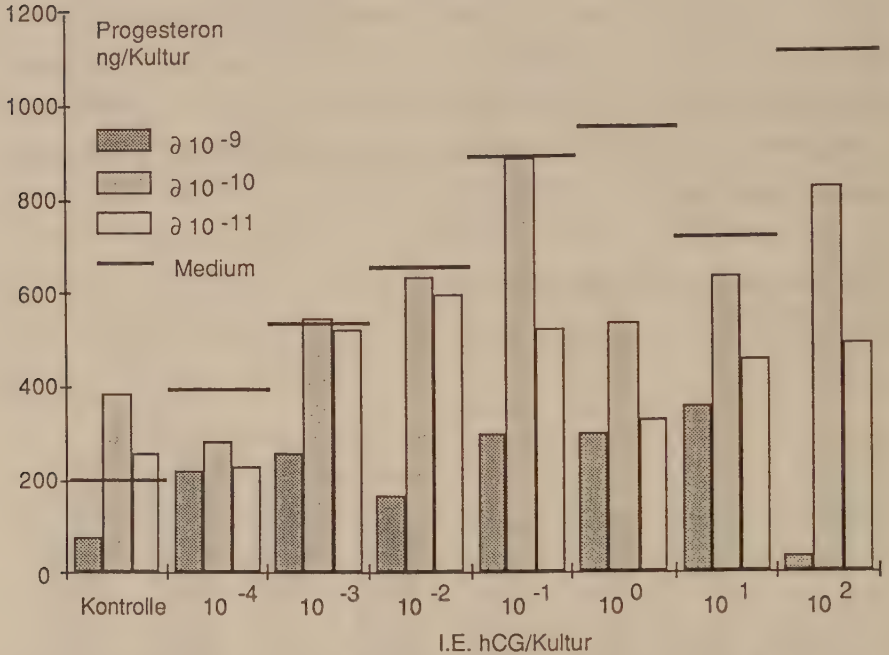


Abb. 12: Wirkung eines Opioidliganden (δ -Ligand) auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion in der Luteinzellkultur; Inkubationszeit 12 Stunden. Jeder aufgetragene Wert entspricht einer Messung aus 3 gepoolten Kulturen des gleichen Versuchs.

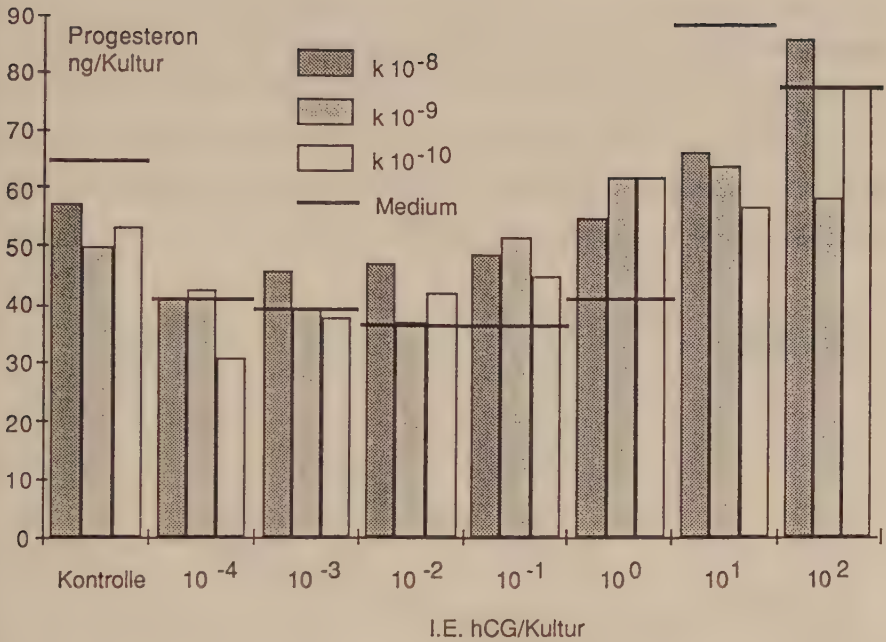


Abb. 13: Wirkung eines Opioidliganden (k-Ligand) auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion in der Luteinzellkultur; Inkubationszeit 12 Stunden. Jeder aufgetragene Wert entspricht einer Messung aus 3 gepoolten Kulturen des gleichen Versuchs.

Um einen eventuellen Einfluß der Opiodeide auf die hCG-Dosis-Wirkungskurve statistisch zu belegen, wurde aus allen Progesteronwerten behandelter und unbehandelter Kulturen eine Regression auf die ansteigende hCG-Stimulationsreihe berechnet; getrennt nach einzelnen Liganden blieb für die Ermittlung dieser Beziehung die Opioidkonzentration unberücksichtigt (Abb. 14).

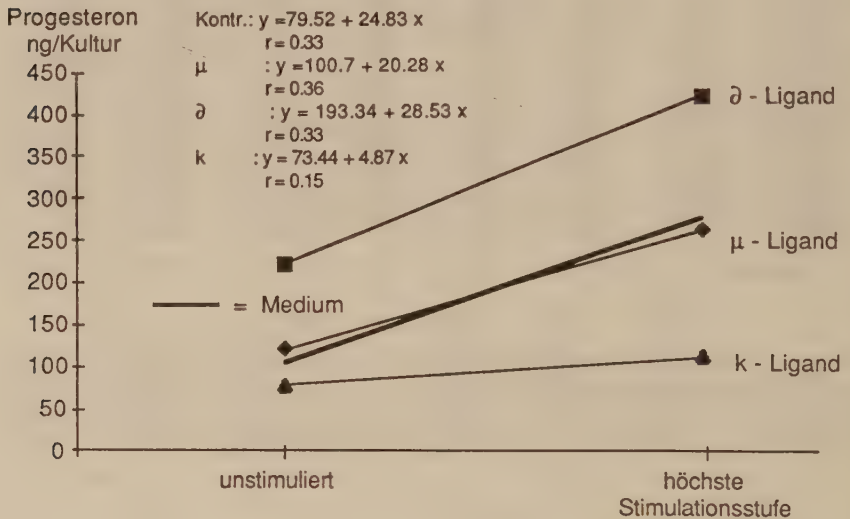


Abb. 14: Regressionsgeraden der Progesteronwerte nach Behandlung mit einzelnen Opioiden auf die ansteigende Stimulation mit hCG; Inkubationszeit 12 Stunden. Anzahl (n) der für die Geraden verwendeten Einzelwerte: Kontrolle = 272; μ -Ligand = 72; δ -Ligand = 48; κ -Ligand = 40.

Mit den Progesteronwerten aus einem Versuch konnten die in den Abbildungen 15 und 16 gezeigten Beziehungen dargelegt werden. In Abb. 15 ist der Opioideinfluß auf das bekannte hCG-Stimulationsprofil erfaßt, wobei die Sekretion der unstimulierten Kultur, gleichgültig, ob sie behandelt oder unbehandelt ist, als Bezugs- wert für die Ermittlung des Verhältnisindex steht.

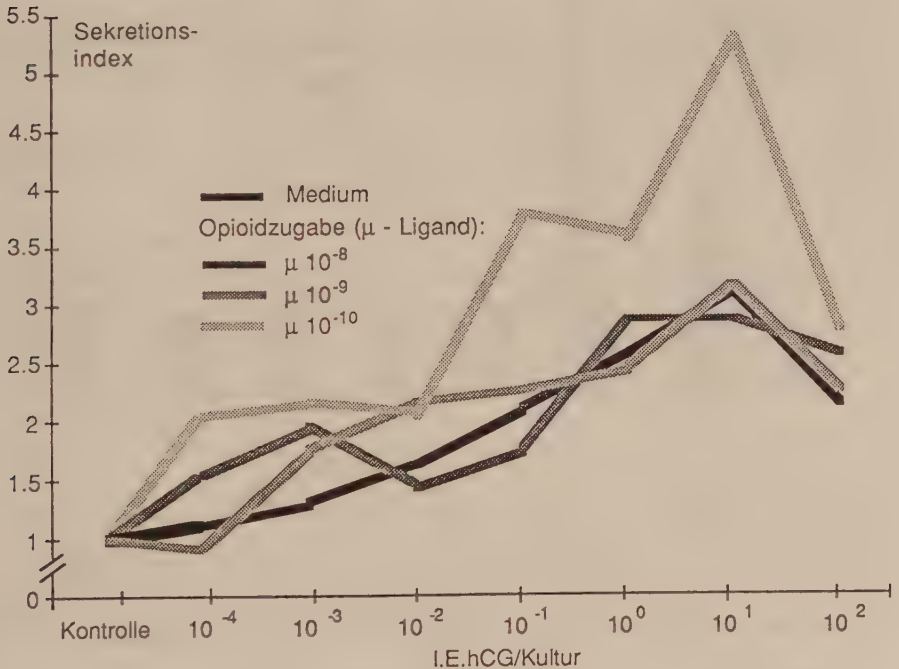


Abb. 15: Opioideinfluß auf die dosisabhängige hCG-Stimulierung der Progesteronsekretion in Luteinzellkulturen. Aufgetragen ist der Verhältniswert (Sekretionsindex) einer Progesteronmessung aus den Überständen dreier gepoolter Testkulturen zum Progesteronwert der jeweils unstimulierten Vergleichskulturen (gleich 1,0 gesetzt). Inkubationszeit 12 Stunden.

Für die Aufzeichnung der Opioidwirkung in jeder einzelnen Stimulationsstufe getrennt wird die Progesteronabgabe zwar auch als Index wiedergegeben (Abb. 16), aber als Bezugswert die Sekretion der unbehandelten, stimulierten oder unstimulierten Kultur, genommen.

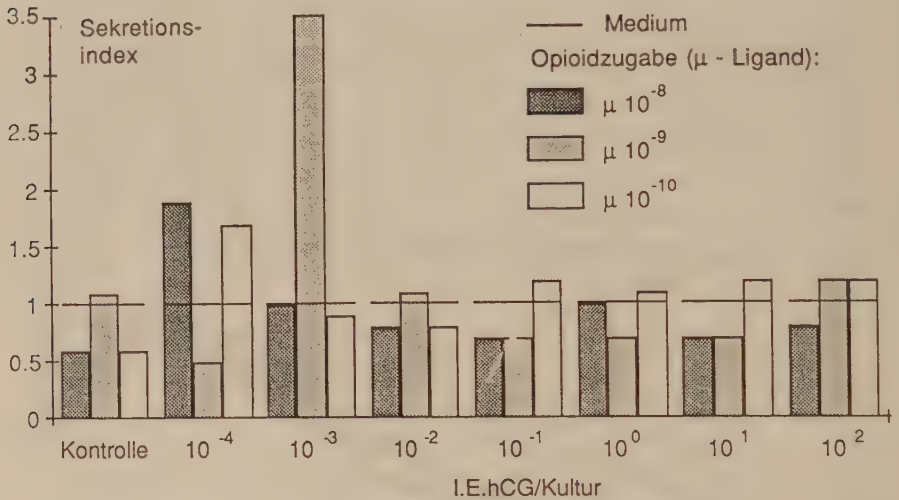


Abb. 16: Darstellung des Opioidinflusses auf die relative Progesteronsekretion kultivierter Luteinzellen in den einzelnen hCG-Stimulationsstufen. Aufgetragen ist ein Verhältnisswert (Sekretionsindex) des Progesterongehalts dreier gepoolter behandelter Kulturen zum Progesteronwert der jeweils unbehandelten Vergleichskultur (gleich 1,0 gesetzt). Inkubationszeit 12 Stunden.

Eine zweifaktorielle Varianzanalyse sollte eine vermutete Abhängigkeit der Progesteronsekretion von der hCG- und Ligandenkonzentration nach 12-stündiger Opioidbehandlung beschreiben (Tabelle 7). Für diese statistische Auswertung wurden die Progesteronwerte logarithmisch transformiert, um die Vergleichsbasis für die weit streuenden Absolutzahlen zu vereinheitlichen.

Tabelle 7: Vergleich der logarithmisch transformierten Progesteronwerte in Abhängigkeit von der Stimulierung und der Konzentration des Opioidliganden.

Variations- ursache	Signifikanzen der F-Werte		
	μ -Ligand (n = 76)	δ -Ligand (n = 44)	k-Ligand (n = 40)
hCG-Stimulations- stufe	0,007	0,076	0,192
Liganden- konzentration	0,858	0,000	0,072

3.3.3.3. Einfluß von Opioiden auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion in unterschiedlichen Inkubationszeiträumen

In den folgenden Untersuchungen wurden die Luteinzellen mit nur drei hCG-Stufen stimuliert, während alle Konzentrationen der Opioidliganden eingesetzt wurden. Dadurch konnten verschiedene Opiode in unterschiedlichen Inkubationszeiträumen unter vergleichbaren Kulturbedingungen ausgetestet werden.

In die graphischen Auswertungen ging nur eine Stimulationsstufe (hCG 10^{-1} I.E.) ein, um die Darstellungen übersichtlicher gestalten zu können.

3.3.3.3.1. μ - Ligand

Nach 3 Stunden hat die sezernierte Progesteronmenge der Luteinzellkulturen schon hohe Werte erreicht (Abb. 17). Der Vergleich zwischen der unstimulierten und der mit hCG 10^{-1} I.E./Kultur stimulierten Kultur, die beide nicht mit dem Opioidliganden behandelt worden sind, zeigt schon in diesem frühen Stadium der Zellkultivierung eine kräftige Stimulationsfähigkeit. Diese Erscheinung ist bei längerer Inkubationszeit - 6 bzw. 9 Stunden - nicht mehr so deutlich ausgeprägt (Abb. 18 und 19).

Die Progesteronsekretion unstimulierter, mit μ -Ligand behandelter Luteinzellen liegt nach 3-stündiger Kultivierung über der Basalsekretion, fällt jedoch mit zunehmender Kultivierungsdauer deutlich unter die vergleichbaren unbehandelten Kontrollen.

In allen Kultivierungsstadien ist die Ausschüttung des Hormons in stimulierten, mit μ -Ligand behandelten Kulturen deutlich höher als in stimulierten, unbehandelten Kulturen; es läßt sich nach 6-stündiger Inkubation sogar eine erhöhte hCG-Stimulationsfähigkeit der mit μ -Ligand behandelten Kulturen feststellen.

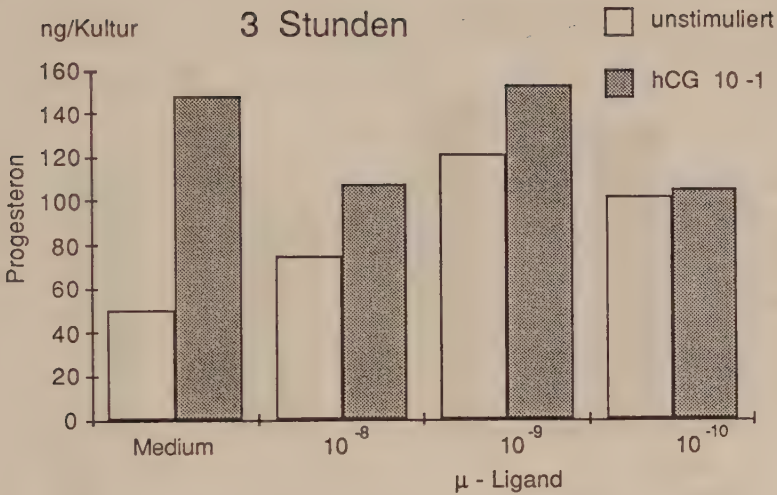


Abb. 17: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (μ-Ligand); Inkubationszeit 3 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

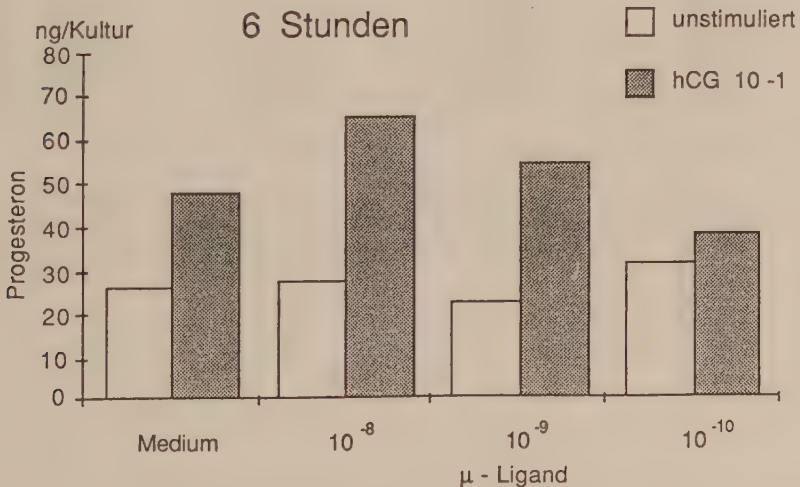


Abb. 18: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (μ-Ligand); Inkubationszeit 6 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

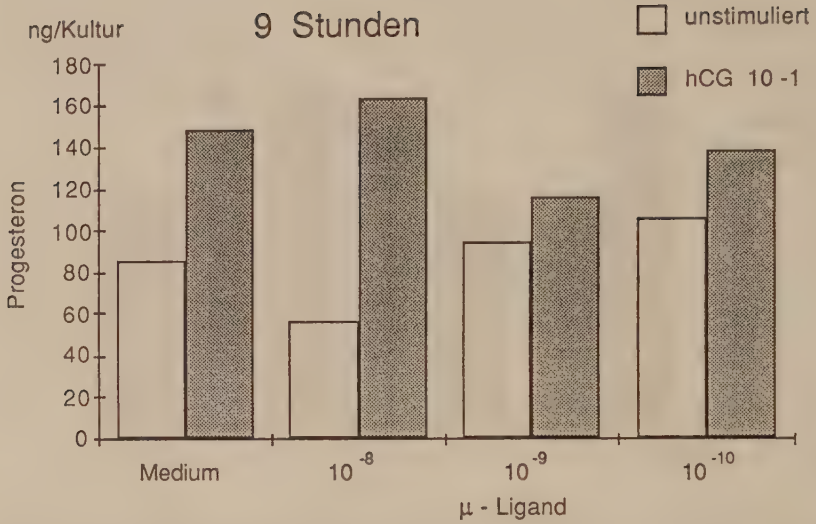


Abb. 19: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Lutein-
zellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (μ -Ligand); Inkuba-
tionszeit 9 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 ge-
poolten Kulturen.

Mehrere Progesteronwerte unterschiedlicher Versuche konnten in Abbildung 20 durch Verwendung von Sekretionsindices zusammen dargestellt werden. Als Bezugsgröße wurde die nicht mit Opioiden behandelte Kultur gewählt.

Dabei zeigt sich der oben angedeutete Effekt noch deutlicher, daß in frühen Kultivierungsstadien durch Behandlung unstimulierter Zellen mit μ -Ligand die relativ höchste Progesteronabgabe erreicht wird.

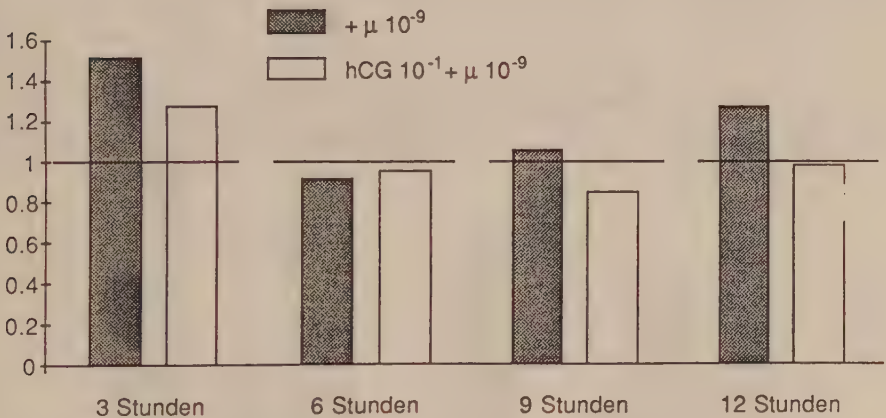


Abb. 20: Beeinflussung der Progesteronsekretion durch einen Opioidliganden (μ -Ligand) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Angegeben ist die relative Sekretion zur jeweils nicht mit Opioiden behandelten Kontrollkultur.

3.3.3.3.2. δ - Ligand

Die Behandlung unstimulierter und stimulierter Luteinzellen mit δ -Ligand ergibt sehr unruhige Sekretionsprofile in den mittleren Inkubationszeiträumen. Nach 3 Stunden Kultivierung kann zwar eine leichte Tendenz zur erhöhten Stimulationsfähigkeit in den behandelten Kulturen entdeckt werden (Abb. 21), nach 6- oder 9-stündiger Progesteronmessung treten jedoch sehr große Schwankungen auf, vor allem in den Werten der Überstände stimulierter Kulturen (Abb. 22, 23).

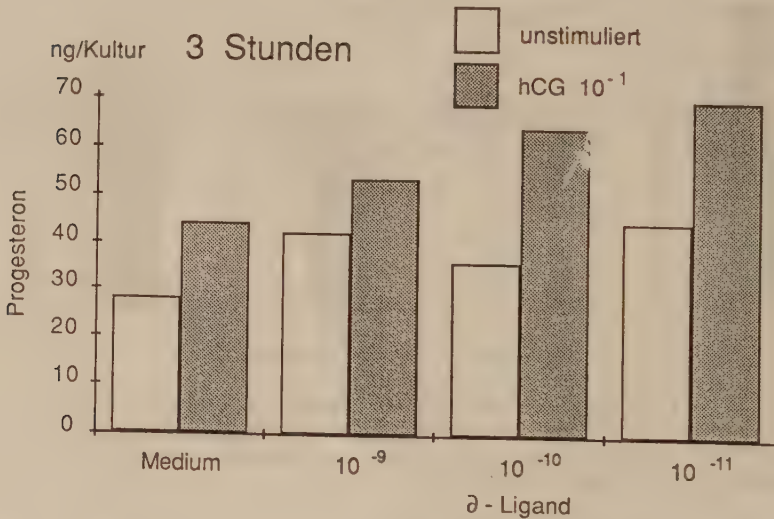


Abb. 21: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (δ -Ligand); Inkubationszeit 3 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

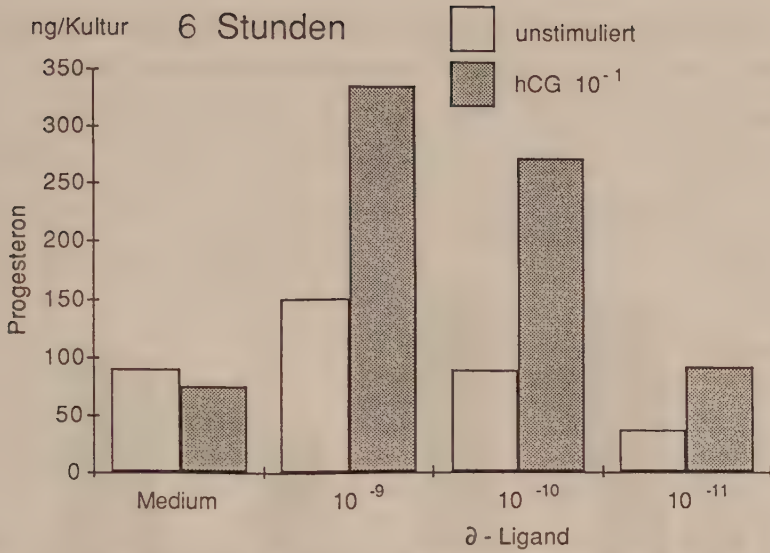


Abb. 22: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (δ -Ligand); Inkubationszeit 6 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

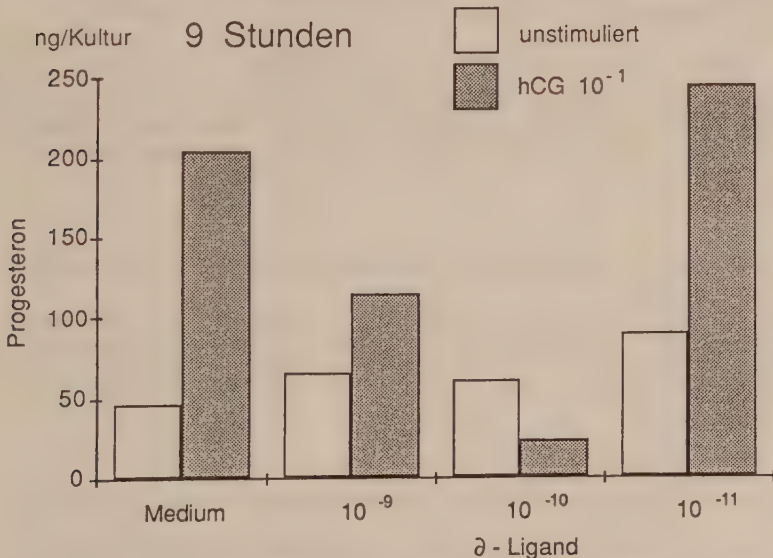


Abb. 23: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (δ -Ligand); Inkubationszeit 9 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

Nach 12 Stunden haben sich die Progesterongehalte bei gleichmäßigen Basal- und Stimulationswerten eingependelt (Abb. 24).

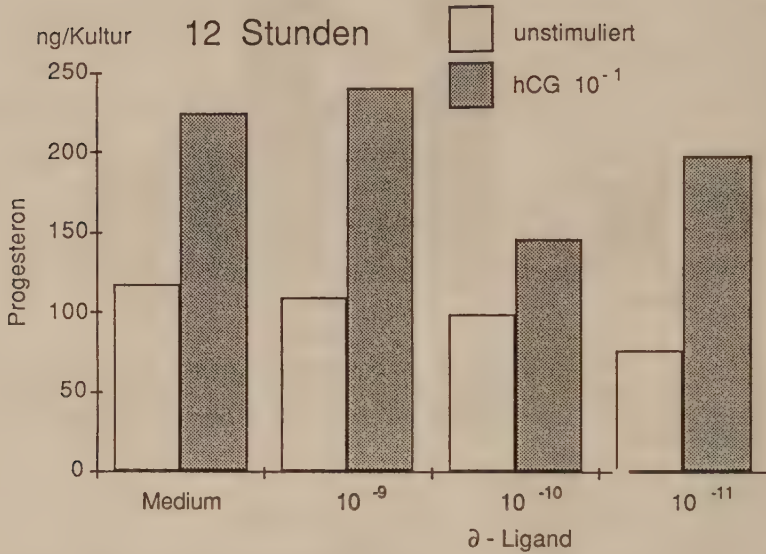


Abb. 24: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (δ -Ligand); Inkubationszeit 12 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

Aus verschiedenen Versuchen mit δ -Ligandenzugabe wurden relative Sekretionsleistungen, als Vergleichswert zur entsprechend unbehandelten Kultur, erfaßt und in ein Diagramm übertragen (Abb. 25).

Ähnlich den Verhältnissen nach μ -Ligandzugabe im gleichen Zeitraum zeigt sich auch hier in frühen Kulturstadien die höchste

Progesteronausschüttung. Es folgt eine starke Depression, die in ihrem weiteren zeitlichen Verlauf wegen fehlender Progesteronwerte nicht abgeschätzt werden kann. Nach 12 Stunden Inkubationszeit liegt der gemessene Hormongehalt behandelter bzw. behandelter und mit hCG stimulierter Kulturüberstände noch deutlich unter dem der entsprechenden Vergleichskulturen.

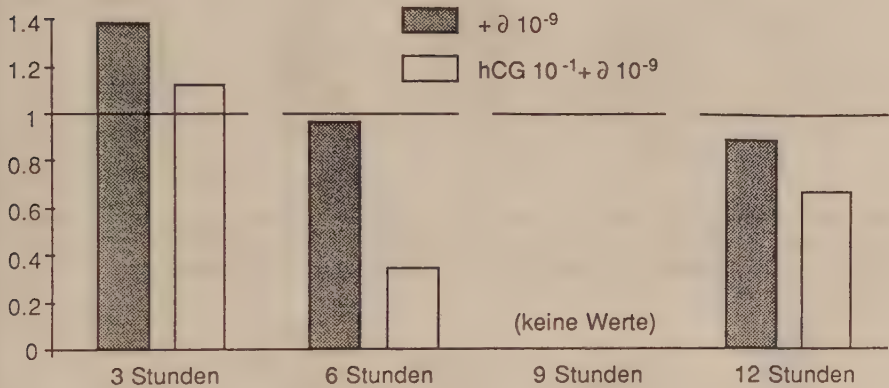


Abb. 25: Beeinflussung der Progesteronsekretion durch einen Opioidliganden (δ -Ligand) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Angegeben ist die relative Sekretion zur jeweils nicht mit Opioiden behandelten Kontrollkultur.

3.3.3.3.3. k - Ligand

Der k-Ligand verändert besonders auffällig das Sekretionsverhalten mit hCG stimulierter Kulturen in den frühen Inkubationszeiträumen (Abb. 26, 27).

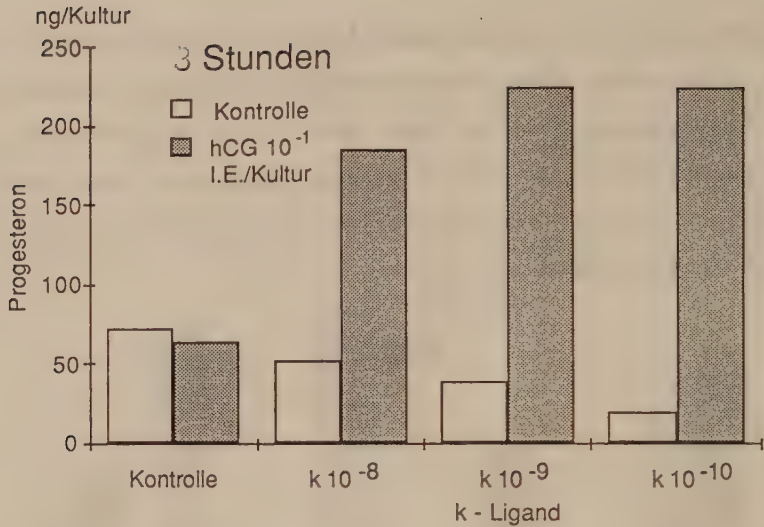


Abb. 26: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (k-Ligand); Inkubationszeit 3 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

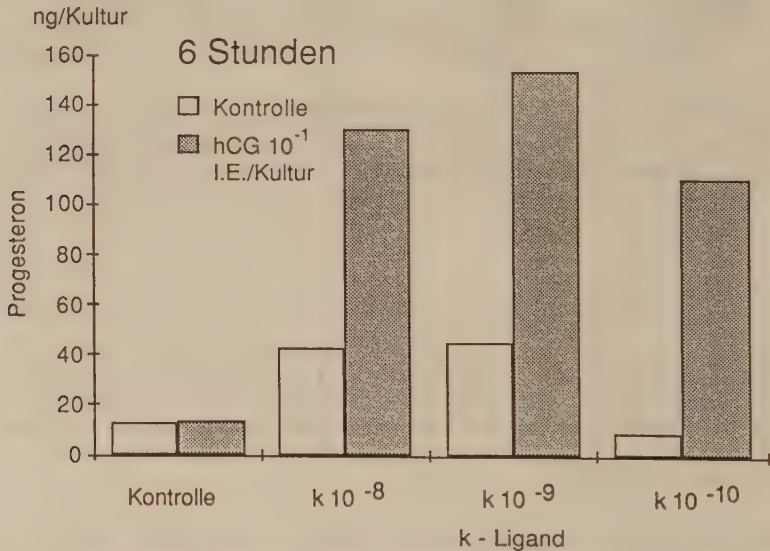


Abb. 27: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (k-Ligand); Inkubationszeit 6 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

Dabei liegen die Progesteronwerte bis zu fünfzehnmal so hoch wie in den entsprechend behandelten, aber unstimulierten Kulturen. Die Basalwerte sind sehr niedrig und geben nach 3 Stunden den Anschein, mit fallender Opioidkonzentration zunehmend gehemmt zu werden; durch die bei gleichsinniger Behandlung steigenden Progesteronwerte stimulierter Kulturen entsteht das Bild einer geöffneten Schere.

Nach 9 Stunden Inkubation stellt sich eine deutliche, in den behandelten Kulturen ausgeprägtere Stimulierbarkeit der Kulturen mit hCG ein (Abb. 28).

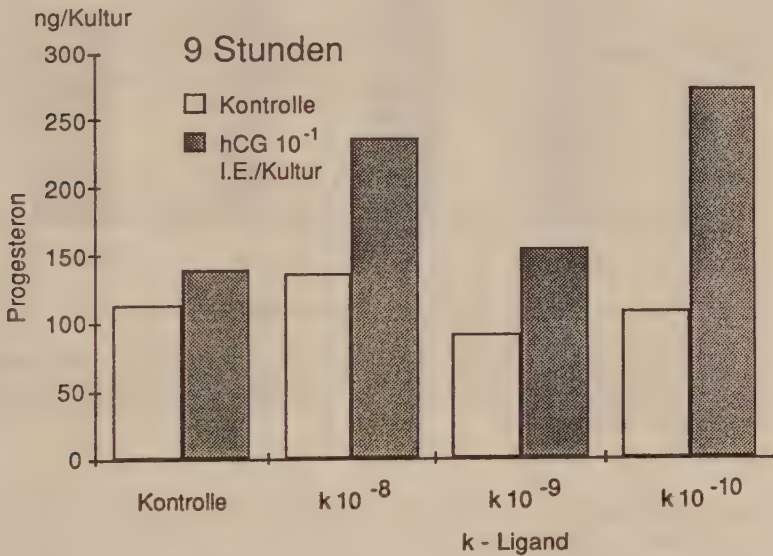


Abb. 28: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (k-Ligand); Inkubationszeit 9 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

Wenn man das nach 12 Stunden erhältliche Progesteronprofil von dem in der Höhe etwas aus dem Rahmen fallenden, mit k-Ligand in der Konzentration 10^{-10} M behandelten, nicht mit hCG stimulierten Wert bereinigt, ergibt sich ein ausgewogenes Sekretions- und Stimulationsverhalten (Abb. 29).

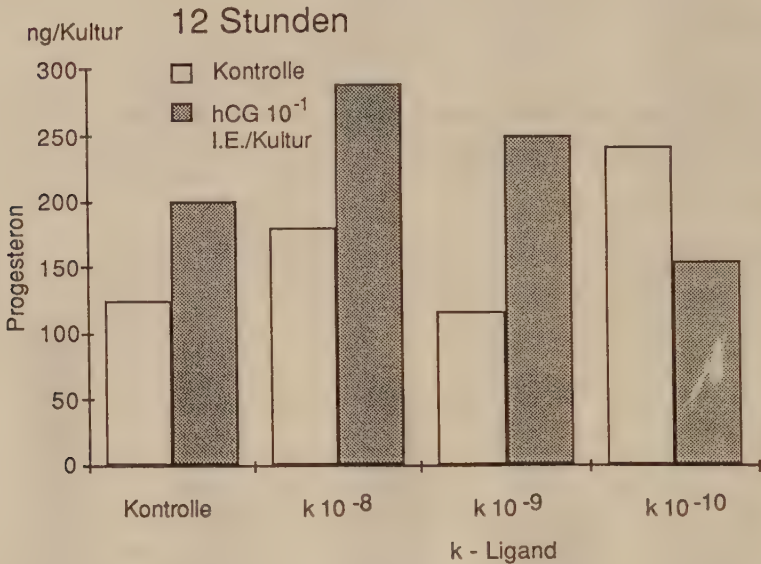


Abb. 29: Basale und stimulierte Progesteronsekretion der Luteinzellkultur nach Zugabe eines Opioidliganden (k-Ligand); Inkubationszeit 12 Stunden. Jedem Wert entspricht eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

Die Auswertung mehrerer Progesteronwerte aus verschiedenen Versuchen, wieder dargestellt als relative Sekretionsleistung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen, bestätigt die Beobachtung, daß

in frühen Inkubationszeiträumen vor allem die stimulierten Kulturen stark durch den k-Liganden zu beeinflussen sind (Abb. 30).

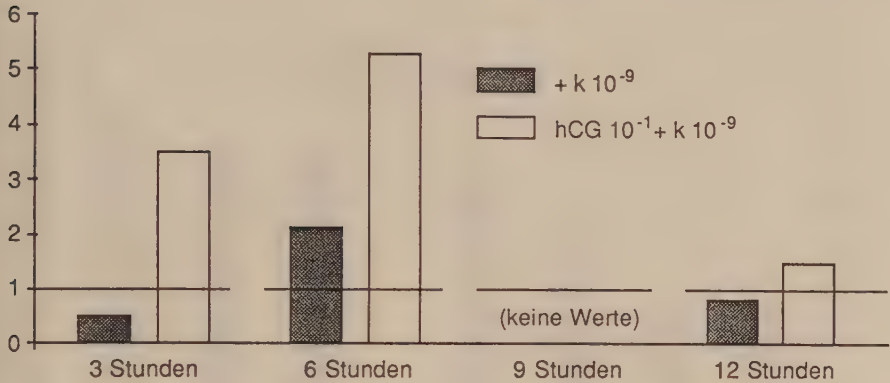


Abb. 30: Beeinflussung der Progesteronsekretion durch einen Opioidliganden (k-Ligand) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Angegeben ist die relative Sekretion zur jeweils nicht mit Opioiden behandelten Kontrollkultur.

3.3.3.3.4. Naloxon

In einem eigenen Versuchsansatz wurde der Einfluß eines Opioidantagonisten, Naloxon, auf die basale und hCG-stimulierte Progesteronsekretion überprüft.

Die Progesteronwerte der Kulturen, die 6 bzw. 9 Stunden inkubiert worden waren, zeigten eine deutliche dosisabhängige Stimulierbarkeit un behandelter und mit Naloxon behandelter Luteinzellen, obwohl nur 3 Stimulationsstufen verwendet wurden (Abb. 31).

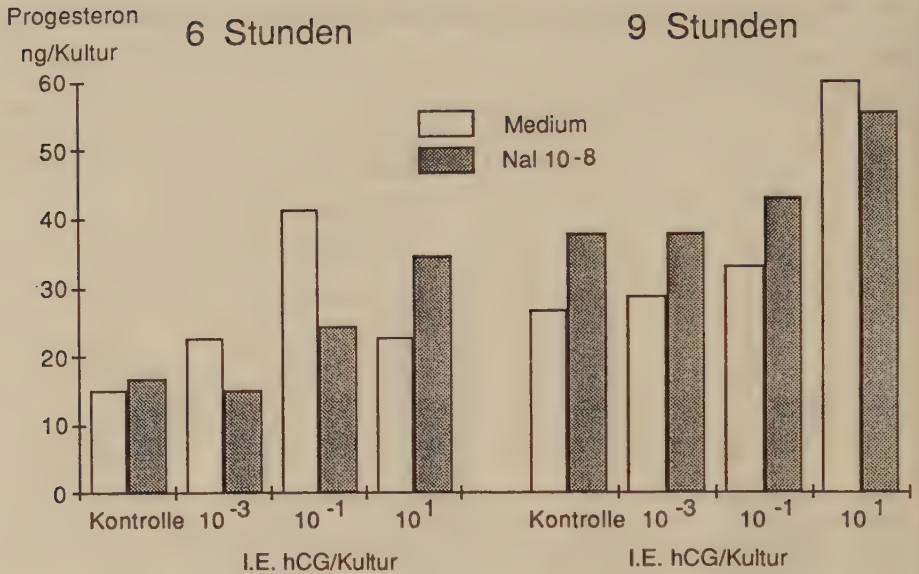


Abb. 31: Vergleich der Wirkung eines Opioidantagonisten (Naloxon) auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion von Luteinzellkulturen in zwei verschiedenen Inkubationszeiträumen (6 und 9 Stunden). Jedem Wert entspricht die Messung aus 3 gepoolten Kulturen.

Beim Vergleich zwischen unbehandelten und 9 Stunden lang mit Naloxon behandelten Kulturen ist ein Sekretionsanstieg nach Behandlung auch bei gleichzeitiger hCG-Stimulation bemerkenswert.

3.3.3.4. Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß von Opioiden

Um im direkten Vergleich den Einfluß verschiedener Opioiden auf die stimulierte und unstimulierte Progesteronsekretion zu überprüfen, wurden im gleichen Ansatz verschiedene Liganden den Luteinzellen zugesetzt. Aus Abbildung 32 ist ein deutlicher Hemmeffekt von κ - und δ -Ligand in einer Konzentration von 10^{-7} M sowohl auf die unstimulierte als auf die stimulierte Progesteronsekretion zu ersehen.

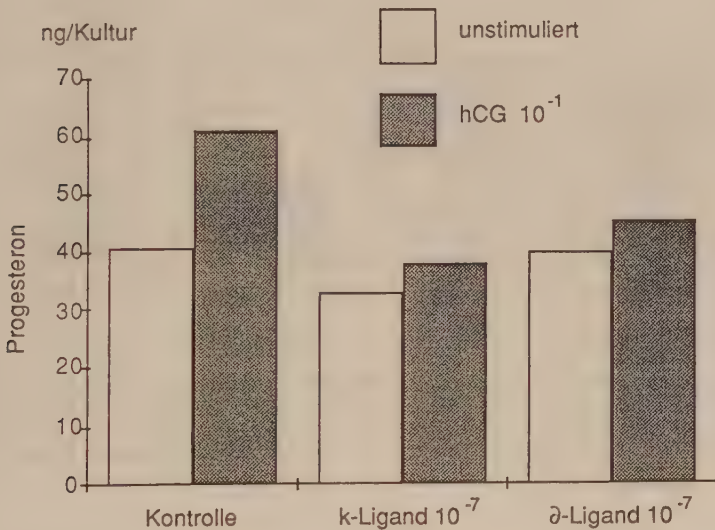


Abb. 32: Stimulationsfähigkeit von Luteinzellen nach Behandlung mit Opioidliganden (κ - und δ -Ligand); Inkubationszeit 12 Stunden.

Der Vergleich der Sekretionsleistung als Index zur jeweils unbehandelten Kultur derselben Stimulationsstufe ergibt das Bild in Abb. 33. Der δ -Ligand bewirkt in der höchsten hCG-Stimulation die relativ größte Sekretion, während der k-Ligand im Vergleich zur Gegenprobe eine abnehmende Sekretionsleistung hat.

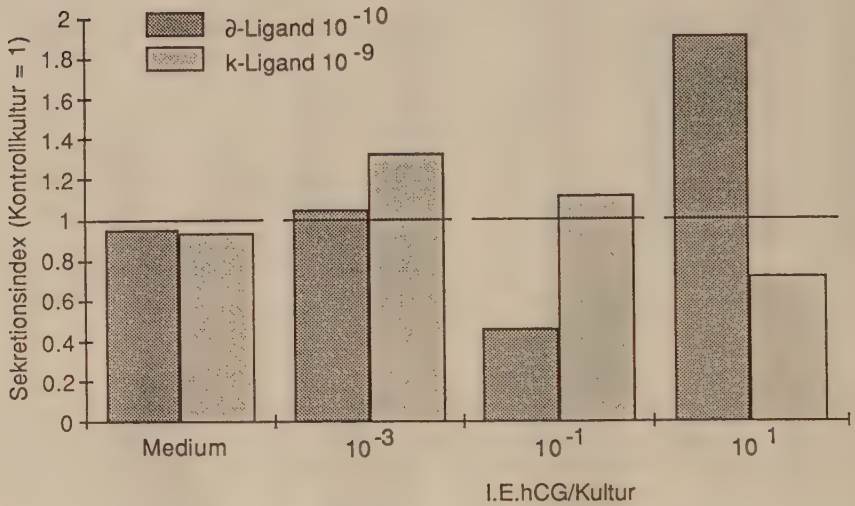


Abb. 33: Sekretionsleistung nach Zugabe von zwei Opioidliganden (δ - und k-Ligand) als Indexwert zum Progesterongehalt je einer Kontrollkultur. Für die Berechnung der Indices diente je eine Messung aus 3 gepoolten Kulturen als Grundlage. Inkubationszeit 6 Stunden.

3.3.3.5. Untersuchungen zur Dauer des Opioidinflusses nach Entfernung der Testsubstanz aus dem Kulturmedium

Die Abklärung der Frage, ob Opiode noch einen Einfluß auf die Progsteronsekretion haben, wenn sie schon für längere Zeit aus dem Kulturmedium entfernt sind, war Gegenstand der folgenden Versuche. Dabei wurde lediglich der μ -Ligand ausgewertet.

Die erste Darstellung (Abb. 34 a, b) berücksichtigt nur eine Stimulationsstufe in der Behandlung mit drei Opioidkonzentrationen. Die Absolutwerte liegen nicht sehr hoch, da durch den zusätzlichen Medienwechsel eine entscheidende methodische Veränderung zu den Kulturen aus vergleichbar langen Inkubationszeiträumen vorgenommen worden ist.

Die Sekretionsprofile lassen sowohl in Abb. 34 a als auch in Abb. 34 b lediglich die bekannte hCG-Stimulierbarkeit erkennen. Bei Behandlung unstimulierter und stimulierter Kulturen wird nur in der Tendenz eine Reduktion der Stimulationsfähigkeit angedeutet.

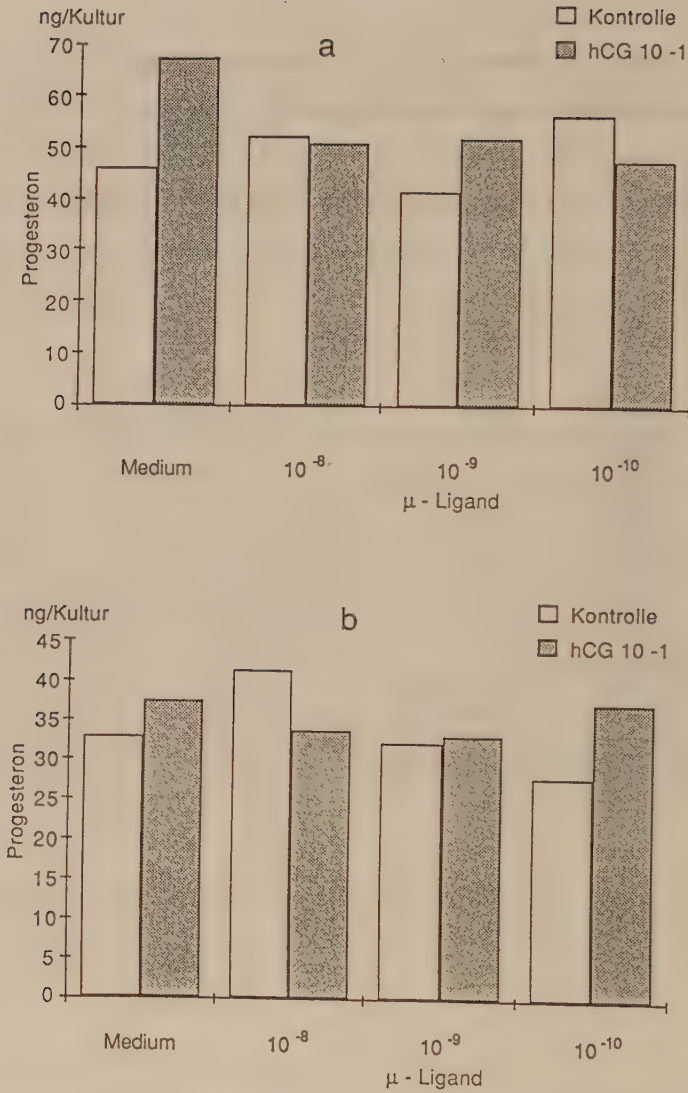


Abb. 34 a und b: Dauer der Wirkung zugefügter Opioidliganden auf die basale und stimulierte Progesteronsekretion in der Luteinzellkultur; Entfernung des μ -Liganden nach 3 (in a) bzw. nach 6 Stunden (in b), Progesteronbestimmung nach 12 Stunden Inkubationszeit.

Einen gleichsinnigen Verlauf des hCG-stimulierten Sekretionsprofils sowohl in der unbehandelten als auch in der behandelten Kulturgruppe vermittelt der Vergleich der zwei Fragestellungen (Abb. 35). Der deutlich dosisabhängigen hCG-Stimulierung der Progesteronsekretion in den unbehandelten Kulturen kann eine auffällige Veränderung in diesem Verhalten der behandelten Kulturen nur bei hCG-Stimulation mit 10^{-1} I.E./Kultur gegenübergestellt werden.

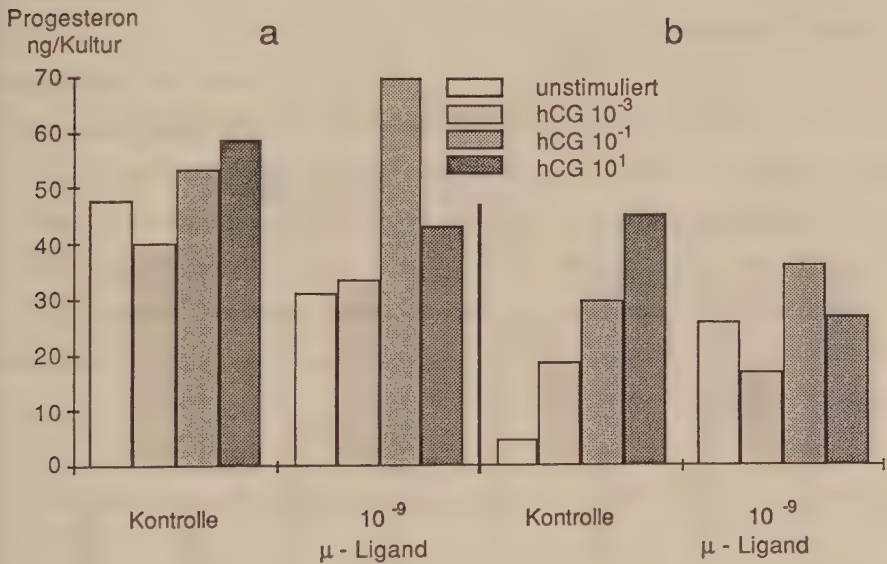


Abb. 35: Dauer der 3- (bei a) bzw. 6-stündigen (bei b) Wirkung eines μ -Liganden nach dessen Entfernung aus dem Kulturmedium auf die nach 12 Stunden gemessene basale und stimulierte Progesteronsekretion in der Luteinzellkultur.

3.3.4. Protein- und β -Endorphingehalt im Zellrasen

Der nach Entnahme des Kulturüberstandes verbleibende Zellrasen der unstimulierten und hCG-stimulierten, jedoch unbehandelten Kulturen wurde für Protein- und β -Endorphinbestimmungen verwendet.

3.3.4.1. Protein

Durch die Ermittlung des Proteingehalts sollte ein Parameter für die Qualität des Zellrasens gewonnen werden. Für Kulturen aus zwei unabhängigen Ansätzen ergaben sich Werte zwischen 0,6 und 1,8 μg Protein/Kultur (Mittelwerte mit Abweichungen s. Tabelle 8); eine Korrelation zwischen dem Progesterongehalt in unstimulierten bzw. stimulierten Kulturen und deren Eiweißgehalt bestand nicht ($r = 0,03$).

Tabelle 8: Proteingehalt und Progesteronsekretion in Luteinzellkulturen ($\bar{X} \pm s$; $n = 8$).

Stimulations- stufe	Progesteron ng/Kultur	Protein μg /Kultur
Unstimuliert	$88,09 \pm 34,17$	$1,012 \pm 0,464$
hCG 10^{-3} I.E./ Kultur	$121,98 \pm 41,85$	$1,012 \pm 0,376$
hCG 10^{-1} - " -	$175,18 \pm 31,94$	$1,05 \pm 0,366$
hCG 10^1 - " -	$170,09 \pm 17,14$	$1,025 \pm 0,271$

3.3.4.2. β -Endorphin

In gesonderten Versuchsansätzen wurden Luteinzellen angezüchtet, die im 12-stündigen Inkubationszeitraum lediglich mit einer hCG-Stimulationsreihe versetzt wurden. In Abbildung 36 sind die aus den Kulturüberständen ermittelten Progesteronwerte dem β -Endorphingehalt des Zellrasens gegenübergestellt worden. Aus der Darstellung ist den mit der hCG-Konzentration ansteigenden Progesteronwerten allenfalls eine gegenläufige Tendenz der β -Endorphinwerte zu entnehmen, die sich aber einer statistischen Signifikanz entzieht.

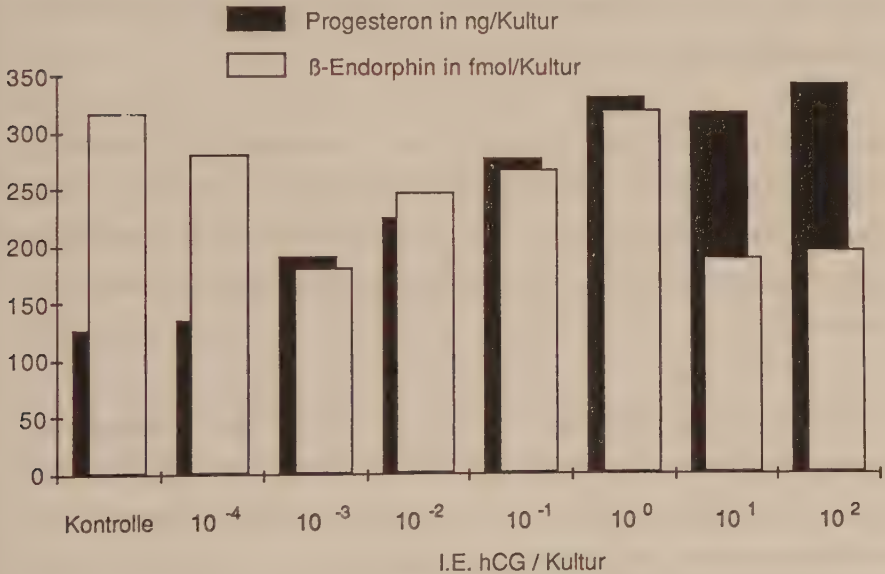


Abb. 36: Vergleichende Darstellung des Gehalts an Progesteron im Kulturüberstand und an β -Endorphin im Zellrasen der gleichen Kulturen eines Versuchs; für 3 verschiedene Messungen pro Stimulationsstufe, deren Mittelwerte in der Abbildung eingezeichnet sind, wurden jeweils 4 Kulturüberstände bzw. Zellkulturen gepoolt.

4. Diskussion

Verschiedene Untersucher führten den Nachweis physiologischen Vorkommens einiger Opiode im Gelbkörper (EHRENREICH et al., 1985; MENEZO et al., 1987). Die bis heute unbeantwortete Frage nach deren Funktion ist experimentell jedoch kaum in vivo lösbar. Zum einen ist der physiologische Status des Opioidsystems im Versuchstier für standardisierte Experimente nicht präzise genug zu eruieren. Zum anderen werden komplexe Mechanismen beim Eingreifen von Opioiden in die zelluläre Regulation vermutet. Dies läßt sich aus den Erkenntnissen folgern, die im Zusammenhang mit der neuroendokrinen Steuerung gewonnen wurden (HERZ, 1984; KALRA, 1983; MILLAN und HERZ, 1985)

Nicht unumstritten sind auch die Funktionsabläufe im Gelbkörper selbst (HANSEL und DOWD, 1986) und die Mechanismen, die in die Progesteronproduktion und -sekretion involviert sind, werden von verschiedenen Autoren in vielfältiger Form dargestellt und interpretiert.

Die meisten Untersuchungen über lokale Effekte am Luteingewebe werden aus diesen Gründen am isolierten Organ durchgeführt. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um eine beliebig reproduzierbare Versuchssituation zu schaffen.

Die von GOSPODAROWICZ (1972) initiierte Technik der Kultivierung von Luteinzellen, um metabolische Studien durchzuführen, wurde von STOCK (1984) zum Sekretionsmodell modifiziert. Dabei wird die Progesteronsekretion, die eine der endokrinen Leistungen des Organs darstellt, als Maßstab für einen Einfluß genommen.

Für die Gewinnung der Luteinzellen wurden zunächst alle zyklischen und von frühgraviden Rindern stammenden Gelbkörper verwendet. Im Vergleich zu zyklischen Gelbkörpern, die meist höhere Vitalitäten aufwiesen, konnten aus Corpora lutea graviditatis der frühen Trächtigkeit die höheren Zellausbeuten erreicht werden. Um vergleichende Untersuchungen durchführen zu können, wurde demzufolge in der Auswertung der Versuchsreihen auf Gelbkörper von frühgraviden Rindern zurückgegriffen.

Der Vorteil der Luteinzellkultur liegt darin, daß Einflüsse von Testsubstanzen in Inkubationszeiträumen von z.B. 3, 6, 9 oder 12 Stunden überprüfbar sind. Um diesen nutzen zu können, ist es jedoch wichtig, einen über einige Stunden stabilen Zellrasen anzüchtet zu haben. In vorliegender Arbeit wurde dies unter anderem durch Zusatz von Pferdeserum erreicht. Da einige Untersucher nicht unerhebliche experimentelle Fehler bei Verwendung von Seren feststellten, wurde eine zweiphasige Inkubation gewählt; in der Testperiode war das Kulturmedium ohne Serum. Dieser Zeitraum stellte die Grundlage für die Untersuchungen über die Wirkung von Opioiden dar. Dabei sollten auch stimulierte Zellkulturen behandelt werden, um eine mögliche Modulation von bekannten Einflüssen miterfassen zu können.

Die Messungen der Progesterongehalte mit einem Enzymimmunoschnelltest entsprachen auch dann der erfordernten Genauigkeit, wenn die Überstände wegen ihrer hohen Hormonwerte entsprechend verdünnt wurden (Tab. 5).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe, die dazu angelegt worden war, als Kontrolle für die grundsätzliche Eignung der Versuchsanordnung zu dienen (Abb. 6,7), stehen in Übereinstimmung mit der kürzlich erneut von BAND et al. (1987) beschriebenen Dosisabhängigkeit der hCG-stimulierten Progesteronsekretion. Der Verlauf der ermittelten Kurve wurde als Anhaltspunkt genommen, um aus den hCG-Konzentrationen repräsentative Stufen herausgreifen zu können. Somit konnten die auf einer Kulturplatte zur Verfügung stehenden Einzelkulturen im dreifachen Ansatz zu vergleichenden Untersuchungen mehrerer Fragestellungen genutzt werden.

Als erstes sollte abgeklärt werden, ob die Progesteronausschüttung unstimulierter Luteinzellen einer Beeinflussung durch Opioide nach 12-stündiger Einwirkzeit unterliegen. Die Ergebnisse zeigen bei allen drei verwendeten Liganden im direkten Vergleich zur unbehandelten Kultur gehemmte Sekretion (Abb. 8-10), wobei nur der δ -Ligand konzentrationsabhängig einzugreifen scheint. Dabei fällt auf, daß je geringer die δ -Ligandenkonzentration, desto stärker ist auch die Hemmung der Progesteronausschüttung (Abb. 9).

Über die Angriffspunkte der Liganden im peripheren Gewebe bestehen noch keine präzisen Vorstellungen. Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich deshalb zunächst nur mit den Progesteronsekretionsmodellen beschreiben, die keine Mediatorsysteme mit in ihre Funktion einbeziehen.

Dabei spielt die Struktur der Gelbkörperzelle eine große Rolle, denn sie ändert sich zwar im Verlauf von Zyklus und Gravidität ständig, zeigt aber bei weitem nicht das Reaktionsvermögen membrangebundener oder freier Second-messenger-Systeme.

Die von GEMMELL et al. (1974) morphologisch schon beschriebenen sekretorischen Granula des Gelbkörpers beim Schaf wurden von HEATHY et al. (1983) beim Rind als Zellbestandteile ausgemacht, die in unmittelbarem Zusammenhang zur Sekretionsänderung nach $\text{PGF}_{2\alpha}$ -gabe stehen. Denkbar wäre hierbei ein ähnlicher Zusammenhang für andere Substanzen, wie z.B. Opiode; die Degranulation der Sekretionsorganellen durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ist wahrscheinlich kein spezifischer Effekt.

Einer statistischen Überprüfung hielten jedoch die Ergebnisse aus der obigen Versuchsreihe nicht stand. Die dadurch immanent werdende Problematik in der Auswertung von Ergebnissen der Zellkulturen wurde für diese Arbeit aber bewußt in Kauf genommen.

Die breit angelegten Versuchsanordnungen sollten nicht beschnitten werden, um so den genannten Schwierigkeiten aus dem Wege gehen zu können. Auf der anderen Seite verlangte dies einen hohen Grad an Standardisierung im Versuchsablauf.

Die Ergebnisse der folgenden Versuche werden daraufhin immer in deutlichem Bezug zur Kontrollprobe angesprochen. Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Versuchen wurden deshalb nicht die Absolutwerte verwendet, sondern auf den Sekretionsindex zurückgegriffen.

Die ersten Ergebnisse aus dem 12-stündigen Inkubationszeitraum, in dem sowohl das Stimulans hCG wie auch als Testsubstanz ein Opioidligand verabreicht wurden (Abb. 11-14), erbrachten zwei neue Meßgrößen.

Die eine bestand aus der unstimulierten, aber behandelten Kultur und konnte im Vergleich zu den stimulierten, gleichsinnig behandelten Kulturen eine Modulation der hCG-Stimulationskurve wiedergeben (Abb. 15). Die andere ist gleichsam die oben genannte Relation, nur beschreibt sie das Verhältnis des unbehandelten zum behandelten Wert für jede der Stimulationsstufen getrennt. Sie kann also, sozusagen in kleineren Einheiten, jeden einzelnen Punkt auf der hCG-Simulationskurve gesondert ansprechen (Abb. 16).

Mit diesen beiden Parametern kann für den μ -Liganden sowohl eine Veränderung der Stimulationskurve bei der niedrigsten Ligandenkonzentration (Abb. 15) als auch eine relativ erhöhte Sekretion (Abb. 16) bei den niedrigsten hCG-Konzentrationen beschrieben werden. Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Fragestellung (s. Tab. 7), in der zusätzlich die Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration mit einging, bestätigte die hCG-Stimulationsfähigkeit der Progesteronsekretion auch bei Zugabe von Opioiden. Die Konzentrationsabhängigkeit des Liganden ist statistisch signifikant für den δ -Liganden und hat keine statistische Bedeutung für den Einfluß des μ -Liganden.

Um einen Einfluß der Opioide auf kultivierte Luteinzellen aufzeigen zu können, mußte berücksichtigt werden, daß die Progesteronsekretion, vor allem die stimulierte, mit Mechanismen verknüpft ist, die eine längere Inkubationszeit in Anspruch nehmen.

Zu dieser Frage hat QUIRION (1982) mit methodischen Richtlinien, speziell für die Peptidforschung, Stellung bezogen. Den wichtigsten drei Kriterien für einen idealen Bioassay - Sensitivität, Spezifität und Selektivität - kann die Luteinzellkultur nur in einer Anforderung gerecht werden: Die Änderung der Progesteronsekretion durch Testsubstanzzugabe bewegt sich im Nanogramm-Bereich. Das zweite Kriterium erfüllen kultivierte Luteinzellen nicht, denn von den zugegebenen Substanzen wirkt keine unmittelbar auf die Hormonausschüttung der Zellkultur. Die Wirkung kann

allerdings auch durch den Einfluß auf die Produktion bzw. Sekretion einer Intermediärsubstanz dargestellt werden, wie es in der Luteinzellkultur mit Progesteron der Fall ist. Das dritte Kriterium trifft für die Luteinzellkultur ebenfalls nicht zu, denn die Luteinzelle reagiert nicht nur auf eine bestimmte Substanz.

Aus den Behandlungen stimulierter bzw. unstimulierter Kulturen in unterschiedlichen Inkubationszeiträumen kann überraschenderweise eine Sekretionssteigerung vor allem in der kürzesten Kultivierungsperiode (3 Stunden) festgestellt werden. Dabei werden die unstimulierten Kulturen durch μ - (Abb. 17-19) und δ -Liganden (Abb. 21-24) in ihrer Sekretion über die jeweilige Kontrollkultur deutlich gesteigert und durch den k-Liganden (Abb. 26-29) gehemmt. Die stimulierten Kulturen erfahren durch erstere zwar immer noch eine Steigerung, jedoch ist sie nicht mehr allzu deutlich. Sehr auffällig ist die relative Erhöhung nach k-Ligandzugabe. Dieser Effekt verstärkt sich in der nächsten Inkubationsperiode noch, während bei μ - und δ -Ligand eine relativ abschwächende Wirkung auf die Sekretion stimulierter und unstimulierter Kulturen in den nächsten Zeiträumen deutlicher wird.

Im Zusammenhang mit dieser Wirkung von μ - und δ -Ligand wäre als Ursache an Toleranzphänomene zu denken, die sich mit zunehmender Kultivierungsdauer in einer abschwächenden Wirkung äußern könnten.

Die Sekretion aus dem Zellkörper heraus wird primär durch makromolekulare Substanzen bewerkstelligt, welche das produzierte Progesteron zur Zellausschleusung an die Membranen herantransportieren. Diese Substanzen können Lipoproteine (CONDON und PATE, 1981) oder spezifische Transportproteine sein (TANAKA et al., 1984), in jedem Fall sind es Substanzen, von denen man eine relativ lange Reaktionszeit erwartet. Da in der Luteinzellkultur nur auf die Progesteronsekretion zurückgegriffen wird, wäre es interessant, in diesem Zusammenhang die Syntheseraten einbringen zu können, da ja die flexiblen Second-messenger-Systeme für diese Verantwortung tragen (HANSEL und DOWD, 1986).

Um die Stimulation durch hCG zu vermitteln treten membrangebundene Rezeptoren (DATTATREYAMURTY et al., 1983) als Mediatoren zu den zunächst für die Produktion zuständigen zyklischen Nukleotiden in Aktion. Auf diesen Ebenen ist auch der in dieser Arbeit beschriebene Einfluß der Liganden zu erwarten, da bei isolierten Zellen Wirkungen, die durch die Zirkulation, nervale Impulse oder ähnliche Faktoren beeinflubar sind, ausgeschaltet werden.

Der Effekt des k-Liganden im Kultivierungsverlauf (Abb. 26-29) stellt sich konträr zu dem Effekt der anderen Liganden dar: Hemmung der Basalsekretion auch in kurzen Einwirkzeiten und deutliche Steigerung der Stimulationsfähigkeit. Dabei muß für den k-Liganden aufgrund seiner komplexen chemischen Struktur ein zelltoxischer Effekt auf die unstimulierten Kulturen mit in Betracht

gezogen werden. Der Effekt auf die stimulierten Kulturen steht dazu in Widerspruch und ist, durch die zusätzliche Beteiligung des hCG-Mechanismus, ohne zu große Spekulationen nicht erklärbar.

Nach Behandlung mit einem Opioidantagonisten, Naloxon, in zwei verschiedenen Inkubationszeiträumen (Abb. 31), wurde vor allem nach 9 Stunden sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Zellkulturen eine Sekretionssteigerung beobachtet. Dies könnte auf eine Beteiligung von endogenen Opioiden an der Progesteronsekretion hindeuten.

Eine direkt vergleichende Darstellung 12 Stunden inkubierter δ - und k-Liganden (Abb. 32) zeigt eine leichte Sekretionshemmung sowie eine Reduktion der Stimulationsfähigkeit. Allerdings sind die Absolutwerte im Vergleich zu anderen aus vergleichbarer Kulturperiode sehr gering. Eine Relativwert-Darstellung von Werten aus dem gleichen Versuch (Abb. 33) ergibt eine leicht dämpfende Wirkung des k-Liganden mit zunehmender hCG-Konzentration, was oben schon beschrieben worden ist.

Im Vergleich zweier unterschiedlicher Ansätze zeigt die Dauer der Wirkung eines Liganden nach dessen Entfernung aus dem Kulturmedium, als sezernierter Absolutwert angegeben, ein gleichsinniges Profil jeweils der behandelten und der unbehandelten Gruppe in ihrer Reaktion auf hCG (Abb. 34 a,b). Überraschend ist dabei die

noch ausgeprägte Stimulierbarkeit; es mußte in diesen Versuchsan-
sätzen nämlich erwartet werden, daß der zusätzliche Medienwechsel
eine negative Nachwirkung auf die Progesteronabsonderung zeitigt.
In der Tendenz zeigt sich aber, daß die Opioiden auch nach Entfer-
nung aus dem Kulturmedium eine Sekretionssteigerung aus stimu-
lierten Luteinzellen bewirken können. Als Wirkursache käme hier-
für die Erscheinung der Abhängigkeit von Opioiden in Frage. Dies
zu klären ist allerdings die Aufgabe gezielter Untersuchungen.

Ein Bild über den physiologischen Status der Luteinzellkulturen
sollten stichprobenartige Bestimmungen von Protein und β -Endor-
phin liefern (Tab. 8). Dabei stellte sich heraus, daß der Pro-
teingehalt verschiedener Kulturen zwar Streuungen bis fast 50 %
aufwies, in den Mittelwerten jedoch nahe beieinander lag. Im Ver-
gleich mit den aus den Überständen ermittelten Progesteronwerten
konnte zwischen beiden keine Beziehung hergestellt werden (Kor-
relationskoeffizient = 0,03).

Die β -Endorphinmessung aus Kulturen je einer Stimulationsstufe,
die nicht mit Opioiden behandelt waren, zeigte in der graphischen
Darstellung dynamisches Verhalten (Abb. 36). In welcher Beziehung
die Werte dabei stehen, läßt sich nicht erkennen; in einem Be-
reich der Stimulationskurve mit mittleren hCG-Konzentrationen
verlaufen β -Endorphin und Progesteron gleichartig ansteigend, in
den Randbereichen - hochstimuliert und unstimuliert - ist das
Verhältnis invers.

Es wäre aufgrund dieser Ergebnisse denkbar, daß die Menge des in den Kulturüberstand sezernierten Progesterons bzw. ein mit der Sekretion verbundener Faktor - z.B. die hCG-Stimulation - den Gehalt endogenen Opioids im Zellrasen reguliert oder umgekehrt.

5. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wird an Hand der bovinen Luteinzellkultur ein möglicher Einfluß von drei Opioidliganden und einem Opioid-antagonisten auf die basale und hCG-stimulierte Progesteronsekretion überprüft.

Zur Gewinnung von Luteinzellen wurden insgesamt 40 Gelbkörper verarbeitet. Von 33 Gelbkörpern konnten Zellen für länger als 12 Stunden angezüchtet werden. Die Bestimmung des Progesterongehalts im Kulturüberstand erfolgte mit einem Enzymimmunoschnelltest.

Für die Auswertung von Versuchsreihen mit Opioiden wurden Zellkulturen, die aus Corpora lutea der frühen Gravidität (Scheitel-Steiß-Länge der Frucht < 13 cm) stammten, ausgewählt. Aus diesem Entwicklungsstadium ließen sich die Luteinzellen mit humanem Choriongonadotropin (hCG) eindeutig dosisabhängig zu vermehrter Hormonabgabe stimulieren (Differenz zur Kontrolle für 10^{-2} und 10^2 I.E. hCG/Kultur $p < 0,05$ und für 10^{-1} , 10^0 und 10^1 I.E. hCG $p < 0,01$).

Nach einer Einwirkzeit von 12 Stunden konnte für μ -, δ - und k -Ligand, von denen jeder in drei Konzentrationen zu unstimulierten Luteinzellen zugegeben worden war, jeweils eine Tendenz zur Hemmung der Progesteronsekretion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen aufgezeigt werden.

Nach 12-stündiger Inkubation mit Opioiden konnte für zwei Ligan-
den (μ und κ) keine auffällige Veränderung der Progesteronsekre-
tion bei gleichzeitiger hCG-Stimulation in sieben Konzentrations-
stufen (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 , 10^1 und 10^2 I.E. hCG/Kultur)
im Vergleich zu den nicht mit Opioiden behandelten Kulturen nach-
gewiesen werden. Nach δ -Ligandenzugabe wurde die Progesteronse-
kretion in Stimulationsstufen mit den höheren hCG-Konzentrationen
($> 10^1$ I.E. hCG/-Kultur) im Vergleich zu den ohne Opioidbehand-
lung stimulierten Kulturen gehemmt.

Nach 3-stündiger Einwirkzeit der Opiode auf die Luteinzellen
konnte die Basalsekretion durch μ - und δ -Ligandenzugabe gesteig-
ert, durch Zugabe des κ -Liganden gehemmt werden. Bei Behandlung
mit letzterem fiel sowohl nach 3- als auch nach 6-stündiger Inku-
bation eine erhöhte hCG-Stimulationsfähigkeit der Luteinzellen
auf, die nicht so ausgeprägt auch für μ - und δ -Liganden nach 6
Stunden Einwirkung zu sehen war. Mit zunehmender Kultivierungs-
dauer (9 bzw. 12 Stunden) wurden diese Opiodeinflüsse weniger
deutlich.

Der Opioidantagonist Naloxon hatte nach 6 Stunden Einwirkung kei-
nen Effekt. Nach 9-stündiger Behandlung steigerte Naloxon sowohl
die basale als auch die hCG-stimulierte Progesteronsekretion.

Eine Einwirkung des nach 3 bzw. 6 Stunden aus dem Kulturmedium entfernten μ -Liganden auf den nach 12 Stunden gemessenen Progesterongehalt ließ sich weder in unstimulierten noch in hCG-stimulierten Kulturen reproduzierbar darstellen.

Im Zellrasen bestimmtes Protein ließ sich nicht mit der hCG-stimulierten und unstimulierten Progesteronsekretion in den Überstand korrelieren ($r=0,03$). Der Gehalt an endogenem β -Endorphin in unstimulierten bzw. mit hCG stimulierten, aber nicht mit Opioiden behandelten, 12 Stunden lang inkubierten Luteinzellen zeigt im unstimulierten bzw. im mit 10^{-4} , 10^1 und 10^2 I.E. hCG/Kultur stimulierten Zellrasen ein umgekehrt proportionales Verhältnis zum Progesterongehalt des dazugehörigen Kulturüberstandes.

Die Ergebnisse zeigen, daß durch die Zugabe von Opioidliganden zu kultivierten Luteinzellen die hCG-abhängige Progesteronsekretion in kurzen Behandlungszeiträumen gesteigert werden kann. Bei längerer Einwirkzeit der Opioiden tritt ein hemmender Effekt auf die Ausschüttung in den Vordergrund. Eine Wechselwirkung zwischen der lutealen Progesteronsekretion und dem endogenen Opioidpeptidgehalt kann daher in Betracht gezogen werden

6. Summary

"Studies on the effects of opioids on the progesterone secretion of cultured bovine luteal cells."

It was investigated whether three opioid ligands and an opioid antagonist could have an effect on the basal and the hCG-stimulated secretion of progesterone in bovine luteal cell cultures.

Though 40 corpora lutea (c.l.) were minced and dispersed to yield luteal cells. From 33 c.l. the cells could be cultured for more than 12 hours. The progesterone in the overlaying medium was determined by an enzyme immuno assay.

To collect data from experiments with added opioids cell cultures of c.l. of early pregnancy (fetus < 13 cm) were chosen. The luteal cells of this stage of development secreted more progesterone in a dose-dependent manner to hCG-stimulation (difference to the control for 10^{-2} and 10^2 I.E. hCG/culture $p < 0,05$ and for 10^{-1} , 10^0 and 10^1 I.E. hCG $p < 0,01$).

After 12 hours presence in unstimulated cell cultures μ -, δ - and κ -ligand, which were given each in three concentrations, showed a tendency to inhibit the secretion of progesterone in comparison to the untreated controls.

In a 12-hour incubation period for two added ligands (μ and κ) no change in secretion of progesterone was seen after hCG-stimulation (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 , 10^1 and 10^2 I.E. hCG/culture) with respect to cultures not treated with opioids. Added δ -ligand decreased the secretion in hCG-stimulated cultures with $> 10^1$ I.E. hCG/culture in comparison to the stimulated, but not opioid-treated controls.

After incubating for 3 hours, μ - and δ -ligand increased and the κ -ligand decreased the basal secretion of luteal cells. κ -ligand also caused after 3 and 6 hours incubation a better response to hCG, which was not so distinct after 6 hours for μ - and δ -ligand. The longer the incubation period (9 or 12 hours) the more difficult it became to see the opioid effects.

The opioid antagonist, naloxone, had no effect on luteal progesterone secretion after 6 hours exposure. 9-hours treatment of naloxone increased the basal and the hCG-stimulated secretion.

An effect of μ -ligand, which was removed after 3 or 6 hours from culture medium, on progesterone determined after 12 hours was not reproducible in unstimulated and hCG-stimulated luteal cell cultures.

The protein content of unstimulated or hCG-stimulated luteal cells attached in the culture dishes had no correlation to secreted progesterone in the medium ($r=0,03$). The β -endorphin content in unstimulated or hCG-stimulated luteal cells not treated with opioids showed after 12 hours of incubation an inverse proportionality with respect to progesterone secretion to unstimulated cells with 10^{-4} , 10^1 and 10^2 I.E. hCG/culture.

By these results it could be shown that opioid ligands increase the hCG-dependent secretion of progesterone from cultured luteal cells in short treatment periods. After longer incubation periods with opioids a decreasing effect on secretion took place. Considerations were made, whether the luteal progesterone secretion and the endogenous opioid peptides could act and react on one another.

7. Literaturverzeichnis

- ALMEIDA, O.F.X., K.E. NIKOLARAKIS, R. SCHULZ and A. HERZ (1987):
A 'window of time' during which testosterone determines the opiate-
tergic control of LH release in the adult male rat.
J. Reprod. Fertil. 79 : 299-305.
- BAND, V., S.M. KHARBANDA, K. MURUGESAN and A. FAROOQ (1987):
Steroid production in vitro by granulosa, theca and luteal cells
from goat ovaries.
Biol. Reprod. 36 : 799-806.
- BATTISTA, P.J. and W.A. CONDON (1986 a):
A role for alternative pathway catecholamines in the regulation
of steroidogenesis in cow luteal cells.
J. Reprod. Fertil. 78 : 275-280.
- BATTISTA, P.J. and W.A. CONDON (1986 b):
Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow
luteal cells in vitro.
J. Reprod. Fertil. 76 : 231-238.
- BATTISTA, P.J., J.P. POFF, D.R. DEEVER and W.A. CONDON (1987):
Biogenic amine regulation of bovine luteal progesterone produc-
tion in vivo.
J. Reprod. Fertil. 80 : 517-522.
- BHANOT, R. and M. WILKINSON (1984):
The inhibitory effect of opiates on gonadotropin secretion is de-
pendent upon gonadal steroids.
J. Endocrinol. 102 : 133-141.
- BLANK, M.S., A. FABBRI, K.J. CATT and M.L. DUFAU (1985):
Direct inhibition of gonadotroph function by opiates.
Trans. Assoc. Am. Physicians 98 : 1-9.
- BROOKS, A.N., N.B. HAYNES, K. YANG and G.E. LAMMING (1986):
Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH
secretion in seasonally anoestrous mature ewes.
J. Reprod. Fertil. 76 : 709-715.
- CAFFREY, L.J., T.M. NETT, J.H. ABEL and G.D. NISWENDER (1979):
Activity of 3- β -hydroxy- Δ^5 -steroid dehydrogenase / Δ^4 -
5- Δ^4 -isomerase in the ovine corpus luteum.
Biol. Reprod. 20 : 279-287.
- CHAMINADE, M., A.S. FOUTZ and J. ROSSIER (1983):
Co-release of enkephalins and precursors with catecholamines by
the perfused cat adrenal in situ.
Life Sci. 33, Suppl. 1 : 21-24.

CHANNING, C.P., J.M. MARSH and W.A. SADLER (1979):
Ovarian follicular and corpus luteum function.
Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 112, Plenum Press, New York.

CHRISTENSEN, A.L. (1975):

Leydig cells.

In: The Handbook of Physiology, Sect. 7, Vol. 5, GREEP, R.O.
and E.B. ASTWOOD (Eds.), 57-94, Am. Physiology Soc., Washington
DC.

CONDON, W.A. and D.L. BLACK (1976):

Catecholamine-induced stimulation of progesterone by the bovine
corpus luteum in vitro.

Biol. Reprod. 15 : 573-578.

CONDON, W.A. and J.L. PATE (1981):

Influence of serum and its lipoprotein fractions on progesterone
synthesis and secretion by bovine luteal tissue in vitro.

Biol. Reprod. 25 : 950-957.

DATTATREYAMURTY, B., P. RATHNAM and B.B. SAXENA (1983):

Isolation of the LH/hCG-receptor in high yield from bovine cor-
pora lutea.

J. Biol. Chem. 258 : 3140-3158.

DIEKMAN, M.A., P.O. O'CALLAGHAN, T.M. NETT and G.D. NISWENDER
(1978):

Validation of methods and quantification of luteal receptors for
LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes.

Biol. Reprod. 19 : 999-1005.

EIDEN, L.E. and J.A. RUTH (1982):

Enkephalins modulate the responsiveness of rat atria in vitro to
norepinephrine.

Peptides 3 : 475-478.

EHRENREICH, H., A. STOCK und R. SCHULZ (1985):

Opiode in bovinen Luteinzellkulturen.

X. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Berlin
14.-15.2.1985, Alete Bericht, 89-92.

ESCH, F., N. LING, S.-Y. YING and R. GUILLEMIN (1983):

Peptides of gonadal origin involved in reproductive biology.

In: Role of peptides and proteins in control of reproduction,
S.M. McCANN and D.S. DHINDSA (Eds.), 275-290, Elsevier, New York.

GEMMELL, R.T. and B.D. STACY (1977):

Effects of colchicine on the ovine corpus luteum: role of micro-
tubules in the secretion of progesterone.

J. Reprod. Fertil. 49 : 115-117.

- GEMMELL, R.T., B.D. STACY and G.D. THORBURN (1974):
Ultrastructural study of secretory granules in the corpora lutea
of sheep during estrous cycle.
Biol. Reprod. 11 : 447-462.
- GOSPODAROWICZ, D. and F. GOSPODAROWICZ (1972):
A technique for the isolation of bovine luteal cells and its ap-
plication to metabolic studies of luteal cells in vitro.
Endocrinology 90 : 1427-1434.
- GULYAS, B.J. (1984):
Fine structure of the luteal tissue.
In: Ultrastructure of endocrine cells and tissues, P.M. MOTTA
(Ed.), 238-253, Martinus Nijhoff, Den Haag.
- HANSEL, W. and J.P. DOWD (1986):
New concepts of the control of the corpus luteum function.
J. Reprod. Fertil. 78 : 755-768.
- HEATHY, E., P. WEINSTEIN, B. MERRITT, R. SHANKS and J. HIXON
(1983):
Effects of prostaglandins on the bovine corpus luteum: granules,
lipid inclusions and progesterone secretion.
Biol. Reprod. 29 : 977-985.
- HERZ, A. (1984):
Multiple opioid receptors.
In: Opioid modulation of endocrine function, G. DELITALA, M.
MOTTA and M. SERIO (Eds.), 11-19, Raven Press, New York.
- HIXON, J.E. and W. HANSEL (1979):
Effects of PGF_{2α}, estradiol and LH in dispersed cell preparations
of bovine corpus luteum.
In: Ovarian follicular and corpus luteum function; Adv. Exp. Med.
Biol., Vol. 112, C.P. CHANNING, J.M. MARSH and W.A. SADLER
(Eds.), 613-620, Plenum Press, New York.
- HOLADAY, J.W., D.M. GILBEAU, C.G. SMITH and L.L. PENNINGTON
(1984):
Multiple opioid receptors in the regulation of neuroendocrine
responses in the conscious rat and monkey.
In: Opioid modulation of endocrine function, G. DELITALA, M.
MOTTA and M. SERIO (Eds.), 21-32, Raven Press, New York.
- HOLZBAUER, M. (1957):
The corticosteroid content of rat adrenals under different
experimental conditions.
J. Physiol. 139 : 294-305.

HUGHES, J. (1981):

Peripheral opioid receptor mechanisms.

Trends in pharmacol. Sci. 2 : 21-24.

HUGHES, J. (1975):

Isolation of an endogenous compound from the brain with the pharmacological properties similar to morphine.

Brain Res. 88 : 295-301.

HSUEH, A.J.W., P.B.C. JONES, E.Y. ADASHI, C. WANG, C.Z. ZHUANG

and T.H. WELSH jr. (1983):

Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats.

J. Reprod. Fertil. 69 : 325-342.

JAFFE, J.H. and W.R. MARTIN (1985):

Opioid analgesics and antagonists.

In: The pharmacological basis of therapeutics, A.G. GILMAN, L.S. GOODMAN, T.W. RALL and F. MURAD (Eds.), 7th edition, 491-531 Mac-Millan Publ. Company, New York.

KALRA, S.P. (1983):

Opioid peptides - inhibitory neuronal systems in regulation of gonadotrophin secretion.

In: Role of peptides and proteins in control of reproduction, S.M. McCANN and D.S. DHINDSA (Eds.), 63-87, Elsevier, New York.

KAWAKAMI, M., K. KUBO, T. UEMURA, M. NAGASE and R. HAYASHI (1981):

Involvement of ovarian innervation in steroid secretion.

Endocrinology 109 (1) : 136-145.

LORD, J., A.A. WATERFIELD, J. HUGHES and H.W. KOSTERLITZ (1977):

Endogenous opioid peptides: multiple agents and receptors.

Nature 267 : 495-499.

MARTIN, W.R. (1967):

Opioid antagonists.

Pharmacol. Rev. 19 : 463-521

MARTIN, W.R., C.G. EADES, J.A. THOMPSON, R.E. HUPPLER and B.E.

GILBERT (1976):

The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog.

J. Pharmacol. exp. Ther. 197 : 517-532

MEITES, J. (1984):

Effects of opiates on neuroendocrine functions in animals: Overview.

In: Opioid modulation of endocrine function, G. DELITALA, M.

MOTTA and M. SERIO (Eds.), 53-63, Raven Press, New York.

- MENEZO, Y., A. CUPO et L. BUENO (1987):
Production d'enkephalines par les corps jaunes humains et bovins.
C. R. Acad. Sc. Paris, t. 304, séries III, n° 12 : 337-340.
- MILLAN, M.H., M.J. MILLAN and A. HERZ (1984 a):
The hypothalamic paraventricular nucleus: relationship to brain
and pituitary pools of vasopressin and oxytocin as compared to
Dyn, β -End and related peptides in the rat.
Neuroendocrinology 38 : 108-116.
- MILLAN, M.J., M.H. MILLAN and A. HERZ (1982):
Lesions of the ventral noradrenergic (norepinephrinergic) bundle
affect brain and pituitary pools of endorphins and the response
of these to stress in rats.
Neuroendocrinology 35 : 449-456.
- MILLAN, M.J., M.H. MILLAN, A. CZLONKOWSKI and A. HERZ (1984 b):
Contrasting interactions of the locus coeruleus as compared to
the ventral noradrenergic bundle with CNS and pituitary pools of
vasopressin, DYN and related opioid peptides in the rat.
Brain Res. 298 : 243-252.
- MILLAN, M.J. and A. HERZ (1985):
The endocrinology of the opioids.
Int. Rev. Neurobiol., Vol. 26, Academic Press Inc.
- MILVAE, R.A., H.W. ALILA and W. HANSEL (1986):
Involvement of lipoxygenase products of arachidonic acid metabo-
lism in bovine luteal function.
Biol. Reprod. 35 (5) : 1210-1215.
- OKUDA, K. (1982):
Morphologische und endokrinologische Untersuchungen am Corpus lu-
teum periodicum und graviditatis des Rindes.
Vet. med. Diss., München.
- PASTERNAK, G.W., S.R. CHILDERS and S.H. SNYDER (1980):
Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of
opiate receptors.
Science 208 : 514-515.
- PERT, C.B. and S.H. SNYDER (1973):
Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue.
Science 179 : 1011-1014.
- PFEIFFER, A., W. SADEE and A. HERZ (1982):
Differential regulation of the μ -, δ - and κ -opiate receptor sub-
types by guanyl nucleotides and metal ions.
J. Neurosci. 2 : 912-917.

PIVA, F., P. LIMONTA, R. MAGGI and L. MARTINI (1984):
Dual effects of the opioids in the control of gonadotropin secretion.

In: Opioid modulation of endocrine function, G. DELITALA, M. MOTTA and M. SERIO (Eds.), 155-169, Raven Press, New York.

QUIRION, R. (1982):
Bioassays in modern peptide research.
Peptides 3 : 223-230.

RHODES, P.R. and J.W. RANDEL (1982):
Effects of several biogenic amines on in vitro progesterone secretion by the bovine corpus luteum.
Comp. Biochem. Physiol. 72 C/1 : 113-116.

RICHTER, W.O., P. KERSCHER and P. SCHWANDT (1983):
 β -END stimulates in vivo lipolysis in the rabbit.
Life Sci. 33, Suppl. 1 : 743-746.

SCHULZ, R. (1987):
Pers. Mittlg.

SCHULZ, R. (1988):
Dependence and cross-dependence in the guinea-pig myenteric plexus.
Naunyn-Schmiedeberg's Archs Pharmac. 337 : 644-648.

SCHULZ, R. und H. EHRENREICH (1985):
Körpereigene Opiode.
Tierärztl. Prax. 13 : 11-27.

SCHULZ, R., M. WÜSTER and A. HERZ (1981):
Differentiation of opiate receptors in the brain by the selective development of tolerance.
Pharmacol. Biochem. Behav. 14 : 75-79.

SCHULTZBERG, M., J.M. LUNDBERG, T. HÖKFELT, L. TERENIUS, J. BRANDT, R.P. ELDE and M. GOLDSTEIN (1978):
Enkephalin-like immunoreactivity in gland cells and nerve terminals of the adrenal medulla.
Neuroscience 3 : 1169-1186.

SCHWANDT, R. (1981):
Lipolytic effects of ACTH and Lipotropin.
Front. Horm. Res. 8 : 107-121.

SHAHA, C., A. MARGIORIS, A.S. LIOTTA, D.T. KRIEGER and C.W. BARDIN (1984):
Demonstration of ir- β -Endorphin- and γ^3 -MSH-related peptides in the ovaries of neonatal, cyclic and pregnant mice.
Endocrinology 115 (1) : 378-384.

- SHEMESH, M., J.F. STRAUSS III and W. HANSEL (1985):
The roles of calcium and protein kinase C in the control of bovine placental progesterone synthesis.
Biol. Reprod. 32, Suppl. 1 : 54 (Abstr.).
- SNYDER, S.H. and R.R. GOODMAN (1980):
Multiple neurotransmitter receptors.
J. Neurochem. 35 : 5-15.
- SPICER, L. (1986):
Minireview: catecholaminergic regulation of ovarian function in mammals: current concepts.
Life Sci. 39 : 1701-1711.
- STANLEY, C.J., A. JOHANSSON and C.H. SELF (1985):
Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays.
J. Immunol. Methods 83 : 89-95.
- STOCK, A. (1984):
Die Luteinzellkultur als Modell zur Untersuchung der Progesteronsekretion von Corpora lutea und Corpus-luteum-"Zysten" beim Rind.
Vet. med. Diss., München.
- TANAKA, T., J.T. DILLHEIMER and J.F. STRAUSS III (1984):
Luteinized rat ovaries contain a sterol carrier protein.
Endocrinology 114 (2) : 533-540.
- TRAMU, G. and J. LEONARDELLI (1979):
Immunohistochemical localisation of enkephalins in median eminence and adenohypophysis.
Brain Res. 168 : 457-471.
- TROUT, W.E. and P.V. MALVEN (1984):
Progesterone facilitates a naloxone-sensitive inhibition of LH-release by endogenous opioids in sheep.
J. Anim. Sci. 59, Suppl.1 : 344.
- VOLLMER, A.M., C. MYTZKA, R.M. ARENDT and R. SCHULZ (1988):
Atrial natriuretic peptide in bovine corpus luteum.
Endocrinology 123 : 762-767.
- VUOLTEENAHO, O., J. LEPPALUOTO and P. MANNISTO (1982):
Rat plasma and hypothalamic β -Endorphin levels fluctuate concomitantly with plasma corticosteroids during the day.
Acta Physiol. Scand. 115 : 515-516
- WALKER, J.M., H.C. MOISES, D.H. COY, G. BALDRIGHI and H. AKIL (1982):
Non opiate effects of Dynorphin and Des-Tyr-Dynorphin.
Science 218 : 1136-1138.

WEBER, E. (1980):

Grundriß der biologischen Statistik.

8. Auflage, G. Fischer Verlag, Stuttgart.

WEISS, G.K., W.G. DAIL and A. RATNER (1982):

Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats.

J. Reprod. Fertil. 65 : 507-511.

WENGER, T. and J. LEONARDELLI (1980):

Circadian and cyclic LH-RH variations in the organum vasculosum of the lamina terminalis of female and male rats.

Neuroendocrinology 31 : 331-337.

WEST, R.E. and R.J. MILLER (1983):

Opiates, second messengers and cell response.

Br. Med. Bull. 39 (1) : 53-58.

WÜSTER, M., R. SCHULZ and A. HERZ (1981):

Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations.

Biochem. Pharmacol. 30 : 1883-1887.

Für die Überlassung des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen bei allen für die Arbeit erforderlichen Maßnahmen möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Professor Dr. W. Leidl bedanken.

Bei Professor Dr. R. Schulz bedanke ich mich für seine anregenden Ratschläge und die gewährte Unterstützung im experimentellen Teil der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Privatdozent Dr. R. Stolla und Dr. Dr. habil. W. Kähn, die mir mit fachlichem Rat zur Seite standen.

Grossen Dank schulde ich Frau B. Schüssler für das Korrekturlesen des Manuskripts.

An alle großen und kleinen Hilfen, die meiner Arbeit und mir zu Teil wurden, danke ich mit viel Dankbarkeit zurück.

Lebenslauf

Wulf Jordan geboren am 21. April 1960 in Lauingen an der Donau als erstes Kind des Forstassessors Hans-Werner Jordan und seiner Frau Ursula, geb. von Hößlin.

1966 Einschulung an der Grundschule in Lauingen.

1967-1970 Besuch der Grundschule in Partenstein/Spessart.

1970-1972 Besuch des Städtischen Gymnasiums in Lohr am Main.

1972 Eintritt in das Gymnasium Carolinum in Ansbach, dort

Mai 1980 Abitur.

WS 1980 Beginn des Studiums an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Feb. 1986 Heirat mit Michaela, geb. Trausch.

Jun. 1986 Geburt der Tochter Lea.

Sep. 1986 Abschluß des Studiums mit Staatsexamen.

Seit November 1986 bin ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

